

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN FITOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE EXTRACTOS
NATURALES Y SU INCORPORACIÓN EN NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS PARA SU APLICACIÓN ODONTOLÓGICA**

Por

OSVELIA ESMERALDA RODRÍGUEZ LUIS

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

Enero, 2015

**EVALUACIÓN FITOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE EXTRACTOS
NATURALES Y SU INCORPORACIÓN EN NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS PARA SU APLICACIÓN ODONTOLÓGICA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS
NATURALES

Por:

OSVELIA ESMERALDA RODRÍGUEZ LUIS

Comité de Tesis

Dr. Abelardo Chávez Montes

Director de Tesis

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

Secretario

Dr. Ramiro Quintanilla Licea

Vocal

Dra. María Julia Verde Star

Vocal

Dra. María Adriana Núñez González

Vocal

**EVALUACIÓN FITOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE EXTRACTOS
NATURALES Y SU INCORPORACIÓN EN NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS PARA SU APLICACIÓN ODONTOLÓGICA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS
NATURALES

Por:

OSVELIA ESMERALDA RODRÍGUEZ LUIS

Dirección de Tesis

Director de Tesis

Dr. Abelardo Chávez Montes

Director externo

Dra. Marianela Garza Enríquez

Asesor externo

Dra. Rocío Castro Ríos

AGRADECIMIENTOS

Dr. Abelardo Chávez, gracias por su apoyo, por ser un guía y quien me ha permitido fortalecer las herramientas de la investigación en productos naturales, por permitirme realizar esta tesis doctoral bajo su dirección y por su capacidad para guiar mis ideas por el camino correcto, pero aún más por las enseñanzas como persona y el entender que hay que disfrutar lo que la vida nos depara en el momento.

Dr. Sergio Galindo, quiero agradecerle de manera especial y sincera por compartir horas de su tiempo a enseñarme a trabajar en un laboratorio de nanotecnología y hacerme crecer con sus enseñanzas y al desarrollo del trabajo.

Dra. Adriana Núñez, por su comprensión, apoyo y siempre amabilidad brindada.

Dra. Julia Verde, gracias por su confianza, apoyo, por escucharme y permitirme ingresar en la investigación de plantas.

Dr. Sergio García, por todo su apoyo incondicional y por compartir su conocimiento y experiencias en el trabajo de laboratorio, por su paciencia y amabilidad.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, quienes conocí durante el desarrollo de este trabajo y que compartieron y fortalecieron mi formación de alguna manera, por su tiempo compartido y experiencias vividas, **Erika, Ángeles, Alfredo, Álvaro, Marlene Silva, Brenda, Janeth, Lily, y sin duda Rosy Sánchez, Manuel, Claudia, Roger,** quienes compartimos tiempos bellos.

Gracias **QBP Vilma Rosa Suárez,** quien me ha enseñado que si te propones algo lo puedes lograr y si caes te puedes levantar y volver a intentar, por su conocimiento compartido y apoyo incondicional pero sobre todo por su sincera amistad.

A mis profesores, por compartir su conocimiento para lograr este trabajo, a ustedes compañeras de C.A, por brindarme su sincera amistad y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado, a través de la beca No. de registro 256972.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y muy en especial al departamento de Química Analítica y Nanotecnología por facilitar sus instalaciones y equipo para la realización de este trabajo, a la **Dra. Marcela González Álvarez** del Departamento de Botánica por la orientación brindada para la clasificación de las plantas utilizadas.

A la Facultad de Odontología, Dra. Rosa Isela Sánchez Nájera y Dra. Marianela Garza Enríquez, por su apoyo brindado durante su administración para dar continuidad al proyecto, facilitando las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular. Por ser ejemplo a seguir en el crecimiento profesional.

Finalmente, al proyecto de investigación con clave No. CB176853 apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT

DEDICATORIAS

Gracias Dios, por ponerme en este camino y permitirme vivir esta experiencia, por las bendiciones que derramas sobre mí y estar a mi lado siempre.

A MI ESPOSO

José Mario

Por tu comprensión e impulso incondicional durante toda mi carrera. Gracias, por estar a mi lado en todo momento y permitirme crecer en el camino de la superación profesional.
Compañero inseparable, fuente de calma y consejo en todo momento.

A MIS HIJOS

Diego, Mauricio y Marijose “mis monitos”

Por ser partícipes directos de mis logros y por entender mis ausencias y angustias.

Los amo

Lo dedico a ustedes, Con todo mi amor

INDICE

Sección	Página
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
NOMENCLATURA.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. MICROFLORA ORAL	2
2.2. CARIES DENTAL	2
2.2.1. Microorganismos biofilm y caries dental.....	3
2.2.2. <i>Streptococcus mutans</i>	4
2.2.4. <i>Candida albicans</i>	5
2.3. TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO.....	5
2.4. PLANTAS MEDICINALES	6
2.4.1. Plantas en el tratamiento de enfermedades orales.....	9
2.4.2. Plantas de interés odontológico.....	10
2.5. NANOPARTÍCULAS	12
2.5.1. Nanopartículas en el área médica.....	14
2.5.2. Nanopartículas en el área Odontológica	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo general.....	19
5.2 Objetivos específicos	19
6. METODOLOGÍA	21
6.1. Obtención de extractos y aceites.....	21
6.1.1 Descripción e Identificación Taxonómica	21
6.1.2 Obtención de los extractos	21
6.1.3 Obtención de aceites esenciales	21
6.2. Caracterización Fitoquímica	22

6.2.1. Cromatografía comparativa.....	22
6.2.2. Métodos químicos para la identificación de grupos funcionales	22
6.3. Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de los extractos naturales	25
6.3.1 Concentración mínima inhibitoria de extractos sin encapsular.....	26
6.4. Preparación de nanopartículas poliméricas cargadas con extracto	27
6.4.1 Caracterización física de las nanopartículas	28
6.4.2 Porcentaje y eficiencia de encapsulación	28
6.5. Caracterización del extracto incorporado en NP por cromatografía gases masas	29
6.6. Liberación <i>in vitro</i> del eugenol encapsulado en las nanopartículas	30
6.7. Actividad antimicrobiana de NP cargadas con aceite de clavo	31
7. RESULTADOS	32
7.1. Identificación del material vegetal, Obtención de Extractos	32
7.1.2. La Clasificación taxonómica de <i>Ocimum basilicum</i> (Albahaca).	32
En la figura 4 se observa la parte área de la planta utilizada en esta investigación. Y según literatura la taxonomía de <i>Ocimum basilicum</i>	32
7.1.3. Clasificación y descripción botánica de <i>Calendula officinalis</i> (Cálendula).....	33
7.1.4. Clasificación y descripción botánica de <i>Syzigium aromaticum</i> (Clavo)	33
7.1.5. Clasificación y descripción botánica de <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo)	34
7.2. Caracterización fitoquímica	34
7.3. Cromatografía en capa delgada (CCD).....	35
7.4. Actividad Antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales obtenidos sin encapsular	37
7.5. Análisis de contenido de las nanopartículas poliméricas	40
7.6. Cinética de liberación <i>in vitro</i> del aceite de clavo a partir de las nanopartículas poliméricas.....	44
7.7. Actividad antimicrobiana con respecto al tiempo de liberación del aceite a partir de las nanopartículas	45
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES.....	53
10. PERSPECTIVAS	54
11. BIBLIOGRAFÍA.....	55

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla 1.	Ecuaciones matemáticas para los modelos utilizados para describir la liberación del eugenol a partir de las NP	30
Tabla 2.	Rendimientos y caracterización fitoquímica de extractos metanólicos y aceites esenciales obtenidos	35
Tabla 3.	Fracciones identificadas en cada extracto y aceite	36
Tabla 4.	Actividad Antimicrobiana del aceite esencial de <i>S. aromaticum</i> sin encapsular, contra <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus gordonii</i> , y <i>Candida albicans</i> ATCC, a las 24 h de exposición	37
Tabla 5.	Concentración mínima inhibitoria de extractos y aceites esenciales sin encapsular contra <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus gordonii</i> , <i>Candida albicans</i> ATCC	38
Tabla 6.	Actividad antimicrobiana con respecto al tiempo de liberación del aceite de <i>S. aromaticum</i> incorporado en NP contra <i>S. mutans</i>	40
Tabla 7.	Modelos matemáticos utilizados para describir la liberación del eugenol	44
Tabla 8	Actividad antimicrobiana con respecto al tiempo de liberación del aceite de <i>S. aromaticum</i> incorporado en NP contra <i>S. mutans</i>	45

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1.	Plantas medicinales con actividad antimicrobiana. Albahaca (A), Caléndula (B), Clavo (C) y Tomillo (D).	12
Figura 2.	Representación sobre la Incorporación del principio activo en las nanopartículas.	13
Figura 3.	Técnica de Nanoprecipitación para la encapsulación del aceite esencial de <i>Syzigium aromaticum</i> (clavo) en nanopartículas poliméricas.	28
Figura 4.	Parte aérea de <i>Ocimum basilicum</i> (Albahaca) y taxonomía.	32
Figura 5.	Flor de <i>Calendula officinalis</i> (Cálendula) y taxonomía.	33
Figura 6.	Capullos de <i>Syzigium aromaticum</i> (Clavo) y taxonomía.	33
Figura 7.	Parte aérea de <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo) y taxonomía.	34
Figura 8.	Cromatografía comparativa del aceite de esencial sin encapsular de <i>Syzigium aromaticum</i> (A5, B5) y <i>Thymus vulgaris</i> .	36
Figura 9.	Efecto de la concentración de polímero (A), Relación de Fase acuosa/orgánica (B) sobre el tamaño de NP.	39
Figura 10.	Tamaño, distribución y morfología de nanopartículas, por espectroscopía de correlación fotónica (A) y por microscopía electrónica de barrido (B).	39
Figura 11.	Análisis de contenido de las NP / estándar (a), formulación de NP / sobrenadante, eugenol, borneol, aceite clavo (b) CC.	41
Figura 12.	Análisis de contenido de las NP / estándar (A), formulación de NP / sobrenadante, eugenol, borneol, aceite clavo (B) CGM.	42
Figura 13.	Actividad antimicrobiana con respecto a la liberación del aceite de <i>Syzigium aromaticum</i> incorporado en NP de Eudragit E100 sobre <i>S. mutans</i> .	43
Figura 14.	Cinética de liberación a pH 5, del eugenol presente en el aceite de <i>S. aromaticum</i> encapsulado en NP.	45

NOMENCLATURA

NP	Nanopartículas poliméricas
CMI	Concentración mínima inhibitoria
GSMC	Cromatografía de gases masas
PNS	Plan nacional de salud
AE	Aceite esencial
DMSO	Dimetil sulfóxido
L	Liposoma
NE	Nanoesfera
NC	Nanocápsula
MP	Micropartículas
LF	liberación de fármacos
TCS	Triclosán
PLGA	Poliláctico co-glicólico
PLA	Polí-láctico

RESUMEN

La caries dental es la principal enfermedad oral que padece la población a nivel mundial. Su prevención se basa en educación sobre higiene oral, además del uso complementario de agentes antimicrobianos. Entre las alternativas de prevención una área prometedora incluye el empleo de extractos de plantas como agentes antimicrobianos incorporados en nanopartículas poliméricas (NP), las cuales, puedan funcionar como vehículos de liberación de extractos, mejorando el desempeño de estos agentes activos naturales.

El objetivo de este trabajo fue obtener extractos de plantas de *Ocimum basilicum* (Albahaca) *Calendula officinalis* (Cálendula) y aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* (Clavo) y *Thymus vulgaris* (Tomillo). Se realizó su caracterización fitoquímica y se evaluó su actividad antimicrobiana mediante dilución en tubo contra células plantónicas de *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* (ATCC), determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI). El extracto con mayor actividad fue incorporado en NP mediante el método de nanoprecipitación (NP) y las nanopartículas se caracterizaron en base a su tamaño e índice de polidispersidad por espectroscopia de relación fotónica; el porcentaje y la eficiencia de encapsulación y mecanismo de liberación del eugenol contenido en el aceite encapsulado, se realizó mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GSMC).

En la presente investigación, se determinó que el aceite esencial de clavo mostró la mayor actividad antimicrobiana con respecto a los demás extractos evaluados. Por medio de GSMC se identificó al eugenol como el componente principal del aceite esencial obtenido por hidrodestilación. Se obtuvieron NP esféricas con tamaño alrededor de 157 nm, el porcentaje y la eficiencia de encapsulación de eugenol presente en el aceite encapsulado fue de 73.16 % y 47 % respectivamente; además de mostrar una liberación *in vitro* de eugenol del 50 % a las 24 horas. Finalmente, la CMI del aceite de clavo sin encapsular e incorporado en NP, correspondió a 125 y 75 µg/mL respectivamente. En base a los resultados obtenidos, es factible incorporar extractos vegetales en NP para su liberación sostenida, siendo una terapia antimicrobiana prometedora dentro del área odontológica.

ABSTRACT

Tooth decay is the main oral disease suffered by the population worldwide. Prevention education is based on oral hygiene as well as complimentary use of antimicrobial agents. Between a promising alternative prevention area includes the use of plant extracts as antimicrobial agents incorporated in polymeric nanoparticles (NP), which, can function as delivery vehicles extracts, improving the performance of these natural active agents.

The aim of this study was to obtain extracts of plants *Ocimum basilicum* (Basil) *Calendula officinalis* (calendula) and essential oils *Syzigium aromaticum* (Clove) and *Thymus vulgaris* (Thyme). Its phytochemical characterization was performed and their antimicrobial activity was evaluated by tube dilution against planktonic cells of *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* (ATCC), determining the minimum inhibitory concentration (MIC). Busiest extract was incorporated in the method by NP nanoprecipitación (NP) and the nanoparticles were characterized based on their size and polydispersity ratio photon spectroscopy; the percentage encapsulation efficiency and release mechanism and eugenol in the encapsulated oil content was performed by chromatography coupled with mass spectrometry (GSMC) gases.

In the present investigation, it was determined that clove essential oil showed the highest antimicrobial activity with respect to the other extracts evaluated. Through GSMC the eugenol was identified as the main component of the essential oil obtained by hydrodistillation. Were obtained with spherical NP size around 157 nm, and the percent encapsulation efficiency of eugenol present in the encapsulated oil was of 73.16% and 47% respectively; in addition, a eugenol in vitro release of 50% at 24 hours. Finally, CMI clove oil unencapsulated (free) and incorporated into NP, corresponded to 125 and 75 ug / mL respectively. Based on the results obtained, it is feasible to incorporate NP plant extracts for sustained release, being a promising antimicrobial therapy within the dental area.

1. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una de las principales enfermedades orales que padece la población a nivel mundial, especialmente en los países en vías de desarrollo, es considerada un problema de salud pública.

Dicha enfermedad se inicia por la acumulación de microorganismos en las superficies dentales pudiendo generar la pérdida de los dientes. Algunos microorganismos con gran relevancia en la producción de la caries dental son el *Streptococcus gordonii* y el *Streptococcus mutans*.

La OMS ha descrito que alrededor de 4 mil millones de personas emplean plantas medicinales para el cuidado de su salud. Por lo que existen investigaciones que sustentan los beneficios de componentes extraídos de las plantas; teniendo México un nivel importante, ya que posee un gran número de especies de plantas hasta 30,000 de las cuales solamente 3,000 han sido estudiadas por sus propiedades medicinales (Cuevas-Sánchez, 2004).

Otra estrategia que se ha explorado en los últimos años consiste en los sistemas acarreadores de fármacos, dentro de los cuales se menciona la nanoencapsulación de fármacos en nanopartículas poliméricas (NP). Estos sistemas coloidales ofrecen ventajas remarcables, tales como la protección del fármaco contra agentes externos que inducen su degradación, el direccionamiento del principio activo a sitios específicos de acción (órganos, tejidos o células) y la liberación de moléculas biológicas como proteínas, péptidos y oligonucleótidos (Jones *et al.*, 2004).

En este contexto el presente trabajo tiene como finalidad evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de *Ocimum basilicum* (Albahaca), *Calendula officinalis* (Cálendula) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) y *Syzigium aromaticum* (Clavo); Encapsular los extractos activos en NP y evaluarlos contra microorganismos patógenos orales, para su posible aplicación antimicrobiana en el área odontológica.

2. ANTECEDENTES

2.1. MICROFLORA ORAL

La microflora oral residente es diversa, debido a la gran cantidad de nutrientes que contiene, y por sus condiciones ambientales, como temperatura y humedad que le suministran condiciones convenientes para el crecimiento y supervivencia de los microorganismos, principalmente los que producen la placa dental o “biofilm” por lo que las bacterias Gram positivas son localizables comúnmente en boca siendo las principales productoras de las enfermedades orales como la caries dental.

2.2. CARIES DENTAL

La política de salud bucal en el periodo 2000-2006 reconoce que en México las enfermedades bucales que se encuentran con una alta incidencia y prevalencia son la enfermedad periodontal y la caries dental. Afectan entre un setenta y noventa por ciento de la población, respectivamente, Plan Nacional de Salud (PNS).

La caries dental es una enfermedad que afecta los tejidos duros de los dientes, produce destrucción de las superficies dentales susceptibles a los ácidos producidos por las bacterias orales como producto de la fermentación de carbohidratos presentes en la boca. (Fejerskov O, 2003).

En todos los grupos poblacionales, la caries dental es una enfermedad crónica prevalente e incidente, considerada como un problema de salud pública bucal en México, causante de una proporción importante de pérdida dental, a pesar de ser un padecimiento prevenible (Vázquez-Nava, 2010).

Actualmente la Organización mundial de la salud (OMS) describe que alrededor del noventa por ciento de los escolares de todo el mundo tienen enfermedades dentales, representando un problema de salud de alcance mundial que afecta a los países industrializados y cada vez con mayor frecuencia, a los países en desarrollo, en especial entre las comunidades más pobres (Mohamed, 2008).

2.2.1. Microorganismos, biofilm y caries dental

Reconocer e identificar las características de los microorganismos productores de caries ha permitido un mejor entendimiento de su papel en la producción de la enfermedad en el hospedador, así como de sus factores de patogenicidad. Las bacterias que producen la enfermedad se agrupan en micro colonias que están encapsuladas en una matriz orgánica de polisacáridos y proteínas, secretadas por células que proporcionan protección, desarrollando así un biofilm en la superficie del diente (Scheie A. 2004; Marsh P. 1999).

Actualmente, se les conoce como biofilm, a las comunidades de microorganismos que crecen embebidas en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo (Íñigo L. U 2005).

El biofilm, está formado por organismos unicelulares, constituidos por múltiples especies bacterianas que las terapias odontológicas actuales, tienen como finalidad eliminar y controlar su presencia. Los biofilms son un mecanismo que junto a otras funciones bacterianas previenen el acceso de los antibióticos a las células bacterianas pudiendo resultar no efectivos (Thien-Fah, M, *et al.*, 2001).

Se ha descrito que ciertas especies orales del biofilm pueden intercambiar material genético asociado a la resistencia antimicrobiana, contribuyendo en gran medida al aumento de cepas resistentes a agentes antimicrobianos empleados en boca, favoreciendo al aumento de enfermedades orales (Maita V, *et al.*, 2004; Bidault P. *et al.*, 2007).

Así mismo, se ha documentado la resistencia bacteriana a antibióticos comúnmente utilizados para tratar las infecciones orales, i.e. cloruro de cetilpiridino, clorhexidina, fluoruros de aminas o productos que contengan tales agentes, han sido reportados con toxicidad. Por ello ha surgido la necesidad de buscar nuevas opciones de prevención y tratamiento que sean efectivas, por lo tanto los efectos adversos de algunos antibacteriales ha conducido la búsqueda de compuestos alternos, siendo los extractos

obtenidos de plantas, los productos que representan una buena promesa ya que han mostrado resultados favorables en la reducción de los biofilm de la placa dental (Tichy J, Novak J. 1998; Badria FA y Zidan OA, 2004).

Los principales microorganismos asociados a la producción de caries son del género de 1) *Streptococcus*, resaltando los siguientes: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus gordonii*. 2) *Lactobacillus* y especies de *Actinomyces* (Marcotte H, 1998).

2.2.2. *Streptococcus mutans*

Son microorganismos que pertenecen al género de los *Streptococcus*, principal género de microorganismos aislados de la cavidad oral. Descritos en 1924 por Clarke a partir de caries de dentina, siendo su primer hábitat las superficies dentarias del hombre, son cocos Gram positivo, se ha reportado que esta especie se aísla de los dientes y que puede actuar como patógeno oportunista, es aislado de la placa dental y de piezas cariadas. Producen polisacáridos de la sacarosa asociados a la maduración de la placa, además de producir ácidos (lactato) derivados del metabolismo de los azúcares de la dieta, por lo que lo identifican como el patógeno primario en la etiología de la caries de esmalte en los niños y adultos jóvenes, caries radicular en ancianos.

2.2.3. *Streptococcus gordonii*

Es un microorganismo con morfología de coco Gram positivo, presente en las placas dentales localizadas sobre la superficie gingival, (supragingivales) maduras, es considerado un colonizador primario de la superficie dental, producen glucanos de la sacarosa que contribuyen a la formación de la placa. (Marsh PD, *et al.*, 2009).

S. gordonii, ha sido considerado un microorganismo de importancia en la formación de la caries dental, juega un papel importante en la cariogénesis ya que coloniza fácilmente las superficies de diente limpio y es capaz de formar biopelículas. Entre las bacterias orales, parece tener mayor afinidad a las superficies duras de la cavidad oral, con capacidad de formación de la biopelícula que es un componente importante de la placa dental humana, en virtud de su capacidad de adherirse a las superficies del diente. La

formación de la placa dental procede a la formación de la caries dental; por lo tanto, interferir con la adherencia bacteriana y la formación de biopelículas en los tejidos dentales puede mejorar la salud oral (Gibson R y Houte, J. 1975).

2.2.4. *Candida albicans*

Es una levadura que se localiza de manera habitual en la cavidad oral, es la especie más común y se puede considerar como un residente de la flora oral, cuando las condiciones de la boca se alteran manifiesta un comportamiento oportunista produciendo infección, donde su principal factor de patogenicidad es la adherencia, su importancia en la producción de enfermedades orales se centra en su asociación con la dieta rica en carbohidratos, factor que permite asociarse en las principales enfermedades orales (Marsh, PD. *et al.*, 2009).

2.3. TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO

La placa dental formada por la acumulación de microorganismos sobre las superficies dentales, mucosa y restauraciones es el principal agente etiológico de las enfermedades orales entre ellas la caries dental, por lo que, la remoción mecánica de la placa dental se considera el principal medio eficaz para su control y evitar así la presencia de enfermedades orales. Por otro lado, existen estudios que describen que el empleo complementario de productos químicos, disponibles en forma de enjuagues bucales, o pastas dentales, sin embargo, estos pudieran resultar no efectivos, ya que los microorganismos forman una matriz gracias a la producción de exopolisacáridos y que aunado a otras funciones bacterianas previene el acceso de los antibióticos a las células bacterianas (Thien-Fah, M, *et al.*, 2001).

Así mismo, se adjudica la resistencia bacteriana a una variedad de antibióticos comúnmente utilizados para tratar las infecciones orales como (penicilinas y cefalosporinas, eritromicina, tetraciclinas, sus derivados y metronidazol) así como otros agentes antibacterianos utilizados en la prevención y el tratamiento de las enfermedades

orales, incluyendo cloruro de cetilpiridino, fluoruros de aminas, o productos que contengan clorhexidina, los cuales además, han sido reportados con toxicidad, este último representa el principal agente empleado en los productos para la prevención, sin embargo, suele producir en los pacientes efectos como pigmentación dental debido a su naturaleza catiónica de la molécula de clorhexidina, además que su actividad se ve reducida rápidamente en la presencia de agentes aniónicos, específicamente los que se encuentran dentro de ciertos tipos de pasta de dientes; o en alimentos, por lo tanto es necesario tener cuidado en su empleo durante la higiene normal, otro efecto reportado es que es responsable de desencadenar modificaciones de la sensibilidad lingual. (Jones, CG. *et al.*, 2000; Quirynen M. *et al.*, 2005).

Por lo tanto los efectos adversos de los antibacteriales actualmente empleados ha llevado a la necesidad de buscar nuevas opciones de prevención y tratamiento efectivas, por lo tanto la búsqueda favorece a indagar en los extractos naturales, ya que sus productos representan una promesa viable mostrando evidencia de actividad sobre los biofilms de la placa dental (Tichy J. *et al.*, 1998; Badria FA, *et al.*, 2004).

2.4. PLANTAS MEDICINALES

Se estima que hay aproximadamente entre 250,000 y 500,000 especies de plantas en el mundo (Borris, 1996). De acuerdo a la OMS se estima que 4 mil millones de personas utilizan plantas medicinales para el cuidado de su salud.

El estudio científico y el uso adecuado de las sustancias de origen natural con fines terapéuticos ha sido sin duda tan antiguo como la astronomía, la física y la medicina. El estudio sistemático de los activos naturales es abordado por la farmacognosia. Esta ciencia se enfoca particularmente al estudio de los principios activos de origen vegetal, animal y mineral, así como de los derivados que pudieran tener una aplicación terapéutica, comercial o industrial. En un sentido más amplio la farmacognosia abarca el estudio de la historia, el cultivo, la recolección, preparación, preservación, comercialización, distribución, identificación y evaluación de los componentes químicos

de origen natural, la farmacología y el uso tradicional de esos compuestos o sus derivados para mejorar la salud y el bienestar del ser humano.

El interés por la medicina botánica se ha incrementado en los últimos años, se ha mostrado mayor preferencia por los productos que contienen “extractos naturales” que por los productos basados en sustancias “sintéticas”. Asimismo el desarrollo de resistencia microbiana hacia los antibióticos, entre otras aplicaciones, ha llevado a investigadores a la búsqueda de plantas con actividad antimicrobiana (Borchers *et al.*, 2000, Torrado Truit 2003; Nostro, *et al.*, 2000).

Se puede definir una “planta medicinal” a todo vegetal que contiene, en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser usadas con finalidades terapéuticas o que son precursores en la semisíntesis quimio farmacéutica. Producen productos llamados principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, sobre un organismo vivo. Su utilidad primordial, es disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico, que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida. Una “planta oficial”, es aquella que por sus propiedades farmacológicas, está clasificada en la farmacopea, que siguiendo sus lineamientos pudiera emplearse en algún medicamento.

Una planta aromática es una planta que sus principios activos están constituidos, total o parcialmente, por esencias. Representando alrededor de un 66 % del total de las plantas medicinales. Se encuentran también las plantas condimentarias o especias, pertenecientes a estas últimas y que por sus propiedades organolépticas son empleadas en los alimentos de ahí que sean aplicadas simultáneamente en ambas áreas, dietético y terapéuticas. Además se encuentran las plantas apícolas o poliníferas, aquellas que atraen las abejas para su alimentación o producción de propóleos. Estos contienen principios activos con efecto terapéutico (Muñoz F. 1996).

Los principios activos son los que definen y ayudan a clasificar las plantas, le brindan sus propiedades y usos terapéuticos. Para elaborar los principios que contienen necesitan agua, energía solar, calor y la luz. Dentro de los principios activos se encuentran:

heterósidos, alcaloides, aceites esenciales, esencias, taninos, entre otros (Pengelly, A. 1996).

Los principios activos se distribuyen de forma desigual en sus diferentes partes: yema, flor, hoja, fruto, tallo, raíz, secreciones, semillas, corteza, bulbo, tubérculo y rizoma que en algunos casos se encuentran distribuidos en toda la planta. Se han reportado alrededor de 12,000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que el 10 % corresponde a metabolitos secundarios (Schultes, R.E. 1978).

De las plantas se obtienen extractos, mediante métodos de extracción, empleándose solventes o una mezcla de disolventes de origen vegetal; entre los solventes empleados se encuentran: acetona, etanol, metanol, cloroformo, hexano; para la obtención de los compuestos como fenoles, derivados de fenoles (quinonas, flavonas, flavonoides, taninos y cumarinas), terpenoides, alcaloides, pectinas y polipéptidos que podrían presentar actividad biológica (Castillo G; Martínez S., 2007). Por lo tanto, la actividad farmacológica de las plantas reside principalmente en los metabolitos secundarios, los cuales se derivan del metabolismo primario de las plantas y han llegado a un primer plano de interés debido a su variada actividad biológica. (Kristo *et al.*, 2001; Urech *et al.*, 2005; Brieskorn *et al.*, 1974).

El empleo de diferentes métodos de extracción de las plantas permite investigar el potencial terapéutico de sus principios activos, del tratamiento de enfermedades en el hombre así como la investigación sobre sus principios activos, su extracción, purificación y evaluación así como el diseño y fabricación de formulaciones para los ensayos clínicos por lo que existen factores que influyen en la concentración de los compuestos químicos presentes en las plantas pudiendo variar entre una y otra, en base, al ambiente que crecen como el clima, el terreno, edad de la planta, cultivo y la técnica de recolección, como por ejemplo, en las plantas maduras es mayor la concentración de alcaloides como en las esencias del orégano, salvia y tomillo donde su concentración aumenta al crecer en terrenos soleados y secos (Ara R. 2004).

2.4.1. Plantas en el tratamiento de enfermedades orales

El uso de la medicina a base de plantas está profundamente arraigada a la cultura mexicana donde se ha incrementado el empleo de la medicina tradicional (Argueta, 1994).

Específicamente para la región norte de México, los usos tradicionales primarios de las plantas incluyen el tratamiento de enfermedades respiratorias, tos, resfriados, bronquitis, amigdalitis, neumonía; enfermedades gastrointestinales, dolores estomacales, diarrea, disentería, problemas dentales, problemas hepáticos, excesiva secreción de bilis, diabetes, indigestión, gastritis, amibiasis, helmintiasis; enfermedades ginecológicas, amenorrea, infecciones vaginales y venéreas, hemorragias; enfermedades de la piel, úlceras, infecciones fúngicas, heridas, y en infecciones oculares (García, Alvarado, Verde Star *et al.*, 2001).

La demanda de plantas medicinales ha crecido en Europa y todo el mundo (Hersch-Martínez, 1995); por lo que, la comercialización de plantas medicinales reporta cada año un negocio de 20,000 millones de dólares en todo el mundo. Siendo un área de investigación con gran importancia a nivel internacional tanto para químicos, biólogos y farmacéuticos (Hersch-Martínez INAH, 1995).

Actualmente, en Estados Unidos, existen productos farmacéuticos que tienen su origen en plantas superiores, sin embargo, pocos son utilizados como antibióticos ya que para este fin hemos confiado en los antimicrobianos como la penicilina, ampicilina y tetraciclina entre otros, que han circulado desde 1950, provocando que el papel de los derivados de plantas sea mínimo. Sin embargo, han sido utilizados indiscriminadamente, causando que cepas bacterianas se adaptaran a ellos y creando mecanismos inhibidores de fármacos.

Por lo que, para dar solución a la problemática de resistencia antimicrobiana, la investigación en el reino vegetal es una alternativa ya que se estima que existen entre 250 a 500 mil especies de plantas con distribución mundial con las características

deseables para explorar una nueva alternativa al alcance (Ahmed *et al.*, 2005; Cowan, 1999; Fabricant y Farnsworth, 2001; Moi *et al.*, 2006; Rojas *et al.*, 2006; Torrado Truiti *et al.*, 2003).

Históricamente se reconoce que en las civilizaciones antiguas utilizaban las plantas, elaborando mezclas, que en forma de pasta se aplicaban en la encía, incorporando miel, goma vegetal o residuos de cerveza como vehículo para fortalecer los dientes y la encía (Fernández, R. y Sánchez, M, 1989, Picasso K. 2006).

En base a lo descrito se propone la búsqueda en los productos naturales ya que representan una ruta alterna para nuevos agentes antimicrobianos, con el fin de encontrar nuevos fitoquímicos (Frame *et al.*, 1998; Sindambiwe *et al.*, 1999; Lall *et al.*, 1999; Newton *et al.*, 2000; Usha *et al.*, 2001).

2.4.2. Plantas de interés odontológico

De la gran diversidad de plantas que han sido reportadas mostrando efecto antimicrobiano, en nuestro país existen un gran número que aún no poseen soporte científico, de ahí que en la presente investigación se pretende estudiar algunas de las plantas reportadas con actividad antimicrobiana para ser evaluadas y para ello se han seleccionado las siguientes y se describen a continuación algunas de sus características (Figura 1).

2.4.2.1. *Ocimum basilicum* (Albahaca)

Nombre científico, *Ocimum basilicum*. Pertenece a la Familia, *Labiatae* sus nombres común, Albahaca, originaria de la India e Indonesia. difundida a América, es una planta herbácea de la familia de las Labiadas de 50 cm de altura, con hojas lanceoladas de color verde claro con flores blancas o rosadas dispuestas en ramilletes terminales, sus partes utilizadas son flores y hojas, dentro de sus contenidos principales resaltan, un aceite esencial rico en estragol, eugenol, linalol, terpenos, sus principales usos comprende su aplicación tonificante, antiespasmódica (Sánchez Govín *et al.*, 2000).

2.4.2.2. *Calendula officinalis* (Caléndula)

Nombre científico: *Calendula officinalis*, pertenece a la familia *Asteráceae*, sus nombres comunes, cálendula, maravilla, flor de todos los meses, flor de difunto; introducida a Europa en el siglo XII, desde donde se extendió al resto del mundo. (Muley *et al*; 2009).

El nombre común proviene del latín *calendae*, primer día del mes. Encontrada actualmente en los jardines como planta ornamental. Es una planta herbácea, mide 30 a 50 cm de alto, con hojas alargadas, dentadas y carnosas con flores amarillas o anaranjadas, dentro de sus contenidos se encuentran, carotenoides, (provitamina A), flavonoides, saponinas, resinas, aceites esenciales, ácido salicílico, se ha reportado usos como antiséptica, antiinflamatoria, cicatrizante, antiplaca, entre otros, (Abarca, S. y Francisco, L. 2014).

Por otro lado se encuentran los aceites esenciales (AE), que son utilizados para referirse a las sustancias líquidas, aromáticas y volátiles, de características lipofílicas que se obtienen a partir de diferentes partes de las plantas a través de métodos físicos, como por ejemplo la destilación con vapor (hidrodestilación), y que llevan en sí misma la huella, olor y sabor, del material vegetal del que proceden. Los AE poseen una química compleja, aunque generalmente consisten en una mezcla de un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etcétera, de peso molecular menor de 400 Da y presión de vapor suficientemente alta para volatilizarse a temperatura ambiente; son derivadas del metabolismo secundario de las plantas y asociadas o no a otros componentes; como los que se obtienen a partir de extractos de *Syzygium aromaticum* y *Thymus vulgaris* (Boutekedjiret C. *et al.*, 2003).

2.4.2.3. *Syzygium aromaticum* (Clavo)

Pertenece a la familia *Myrtaceae*, su nombres común es, clavo y su origen es las islas Molucas y Filipinas, se cultiva en Asia y América, es un árbol de la familia de las *Mirtáceas*, alcanza 10 a 20 m de altura, los clavos son las yemas (botones florales) que se recolectan en el momento que se ponen rojas al secarlas al sol y adquieren un color pardo sus partes utilizadas son los botones florales secos y su contenidos principales son alrededor de 15 a 20 % de esencia constituida en su mayor parte por eugenol,

acetileugenol, cariofileno, metilamilcetona a esta esencia se debe su aroma y sus propiedades, dentro de sus usos principales destacan , analgésico bucal y antiséptico, (Hakki M. A, *et al.*, 2007).

2.4.2.4. *Thymus vulgaris* (Tomillo)

Pertenece a la familia *Labiatae*, su nombre común es tomillo, es una planta aromática, herbácea, originaria de los países del mediterráneo especialmente frecuente en occidente, en regiones templadas del continente americano, empleada por los egipcios en los ungüentos para embalsamar por su capacidad para impedir la putrefacción y la proliferación bacteriana por su contenido de timol y carvacol. Arbusto de 30 cm de altura, de hojas pequeñas ovaladas con sus bordes vueltos hacia abajo. Con flor pequeña terminal y de color rosado o blanco, sus partes utilizadas son las hojas y flores, contiene, timol en un 40 %, carvacrol en un 1-2 %, además de otros monoterpenos como el p-cimeno, borneol y geraniol que a esta esencia se le confieren parte de sus propiedades. Contiene además: flavonoides, ácidos fenólicos que contribuyen a potenciar las propiedades de la esencia. (GallardoVázquez *et al.*, 1992).

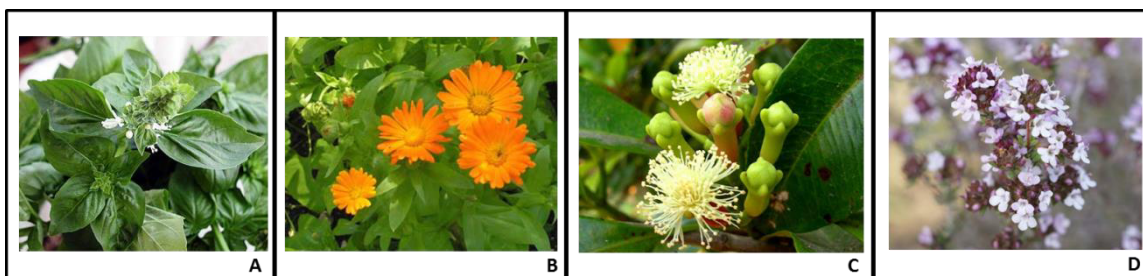


Figura 1. Plantas medicinales con actividad antimicrobiana. Albahaca (A), Cálendula (B), Clavo (C) y Tomillo (D).

2.5. NANOPARTÍCULAS

En la actualidad, la ciencia farmacológica realiza estudios que en los últimos años permiten evidenciar el empleo de vehículos que sean capaces de transportar los fármacos hasta su lugar de acción, a fin de evitar, en lo posible, sus efectos adversos. De acuerdo a

este criterio, se han desarrollado últimamente nuevos sistemas de administración de fármacos, por ejemplo las micropartículas, (MP) liposomas (L) y las nanopartículas (NP), entre otros, siendo los particulados coloidales los que preferentemente se emplean como sistemas de liberación de fármacos (LF) (Valero *et al.*, 1985).

Las NP pueden estar preparadas de diferentes materiales como proteínas, polisacáridos y polímeros sintéticos. La selección de la matriz de estos materiales es dependiente de algunos factores entre los que se encuentran: Tamaño requerido de las NP, propiedades inherentes del fármaco, antigenicidad del producto final y vía de administración. (Mohanraj y Chen, 2006).

El término NP es el nombre colectivo que recibe tanto nanoesferas (NE) como nanocápsulas (NC), las cuales difieren entre sí de acuerdo a la composición y organización estructural. Estos coloides presentan una estructura matricial o capsular polimérica que puede atrapar, encapsular o adsorber fármacos, son potenciales sistemas acarreadores de sustancias activas de carácter hidrofóbico o hidrofílico. Las NE y las NC pertenecen al término de NP. Las NC son sistemas vesiculares, donde el fármaco es transportado en una cavidad que consiste en un núcleo interno (acuoso u oleoso) rodeado por una membrana polimérica (Couvreur *et al.*, 1995). En la NE, el componente activo puede estar incorporado o adsorbido en su estructura, en la superficie de la esfera o encapsulada (Figura 2) (Llabot *et al.*, 2008).

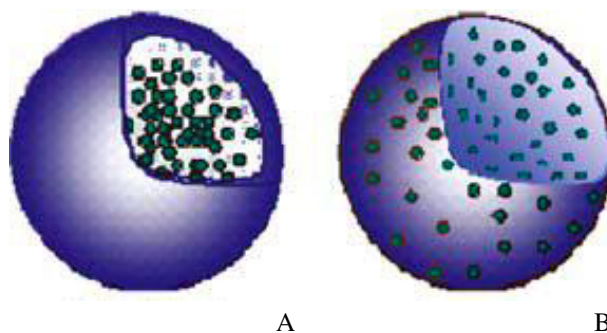


Figura. 2. Representación sobre la incorporación del principio activo en Nanopartículas tipo Nanocápsulas (A) o Nanoesferas (B).

Las NP muestran diversas ventajas sobre las micropartículas y los liposomas, debido a su gran estabilidad y a la capacidad de liberar el fármaco de manera controlada (Mc Clean *et al.*, 1998).

2.5.1. Nanopartículas en el área médica

Las nanopartículas poliméricas (NP) son definidas como un sistema disperso de partículas sólidas con tamaños entre 10 y 1000 nm. Pueden ser preparadas a partir de macromoléculas naturales o sintéticas, estos sistemas coloidales desde el punto de vista farmacéutico han sido investigados debido a sus ventajas, como por ejemplo, la protección que brindan al principio activo incorporado del medio que lo rodea, así mismo la capacidad de liberar de forma controlada al fármaco, y que pueden administrarse por vía oral, parenteral o local e inclusive pueden ser diseñados para lograr su direccionamiento (targeting) a una célula o tejido blanco (Galindo *et al.*, 2005).

Basándose en estas propiedades, numerosos estudios han mostrado que las nanopartículas poliméricas no sólo pueden aumentar la eficacia terapéutica del fármaco encapsulado, sino que también pueden disminuir los efectos adversos y/o tóxicos de los mismos. (Moshfeghi *et al.*, 2005). Así mismo las NP han sido usadas para ser direccionadas a superficies de mucosas. Por ejemplo, un estudio en el que emplearon NP de quitosán para la entrega de fármacos en la región extra ocular (córnea y conjuntiva) y demostraron que las NP cargadas con fármaco permanecen asociadas a las estructuras extra oculares por un período de 48 horas. Concluyeron que la formulación de NP proporcionaba una mejor entrega del fármaco debido a que promueve y controla la liberación del mismo, esto al ser comparadas con los tratamientos convencionales administrados en la región extra ocular (De Campos, *et al.*, 2001).

Otra característica importante mencionar es que las NP pueden proteger a los fármacos susceptibles de degradación por agentes externos como luz y el pH, lo que fue estudiado por investigadores que describen que la encapsulación de la insulina en NP de 300-350 nm, preparadas con una mezcla de un polímero biodegradable y otro no biodegradable, permite la preservación de su actividad biológica, lo que lleva a la prolongación de su

acción y su absorción oral en un modelo de rata diabética (Damgé C., 2007). Así mismo se ha determinado que las NP pueden incrementar la biodisponibilidad de los fármacos, lo que fue estudiado por investigadores que administraron por vía oral, en ratas, una formulación de NP de polí (DL- láctico-co-glicólico) y alginato cargadas con antimicóticos (clotrimazol y econazol) y encontraron que la formulación aumentaba la biodisponibilidad oral de los fármacos, al ser comparada con fármacos no encapsulados (Pandey *et al.*, 2005).

Pueden ser diseñadas para dar perfiles de liberación prolongada de sustancias activas poco solubles en agua; Nimesh y col. prepararon NP con un diámetro de 85 nm por polimerización, a partir de acrilamida-2-deoxi-glucosa y observaron que la liberación del activo era dependiente del pH, además de que la formulación de NP se sometió a pH diferentes (5.0, 7.4 y 8.0) y encontraron que a un pH de 7.4 la liberación del activo era de 70 % mientras que a un pH de 5.0 solo se liberaba el 43 %, estos resultados indican claramente que polímeros de diferente naturaleza pueden utilizarse para modular el perfil de liberación de fármaco a diferentes valores de pH (Nimesh S. *et al.*, 2006).

2.5.2. Nanopartículas en el área Odontológica

En este contexto, algunos estudios han utilizado las NP como en el caso siguiente en el que se realizó un estudio del transporte *in situ* de nanopartículas a través del epitelio sulcular por medio de microscopía confocal laser (MCL) la difusión de nanopartículas biodegradables cargadas con rojo nilo (marcador fluorescente) desde el surco gingival a través del epitelio sulcular de mandíbula de puerco analizándose la penetración de NP hacia el tejido a diferentes intervalos de tiempo. Los resultados sugieren que las NP pueden en boca constituir un sistema acarreador para la liberación de agentes terapéuticos hacia la bolsa periodontal y convertirse en un tratamiento local efectivo para las enfermedades periodontales (Mendoza Muñoz *et al.*, 1998).

Otro estudio evaluó la producción y caracterización de NP cargadas con triclosán (TCS) por el proceso de emulsificación difusión, en un intento de obtener un sistema de entrega adecuado para el tratamiento de la enfermedad periodontal. Las NP de triclosán se prepararon utilizando poli (D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA), poli (D, L-láctico) (PLA)

y el acetato ftalato de celulosa (CAP) con alcohol polivinílico (pval) como estabilizador. Los lotes fueron preparados con diferentes cantidades de TCS, con el fin de evaluar la influencia de drogas en las propiedades de NP de TCS. Se obtuvieron tamaños de partículas inferiores a 500 nm de diámetro. La eficiencia de atrapamiento fue superior a 63.8 %. Posteriormente, un estudio preliminar en el estudio *in vivo* en perros con defectos periodontales inducidos sugirió que NP cargadas con TCS penetran a través del epitelio de unión. Con lo anterior, se describe la aplicación de las NP como reservorio para el control de microorganismos orales del surco gingival. (Mendoza Muñoz *et al.*, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

En todos los grupos poblacionales, la caries dental es una enfermedad crónica prevalente e incidente, considerada como un problema de salud pública en México, es causante de una proporción importante de mortalidad dental (Vázquez-Nava, *et al.*, 2010). La Organización mundial de la salud (OMS) describe que un 90% de los escolares de todo el mundo padecen enfermedades dentales, representando un problema de salud de alcance mundial (Mohamed, 2008).

Los efectos adversos de algunos antibacteriales empleados por los odontólogos ha llevado a la necesidad de buscar alternativas de prevención y tratamiento que sean efectivas, siendo los extractos vegetales productos prometedores ya que han presentado efecto antimicrobiano con aplicación dental.

En este contexto, en el presente estudio se desarrolla una formulación de NP cargadas con extractos vegetales como una alternativa para el tratamiento antimicrobiano preventivo contra patógenos orales, dicha formulación permitirá una liberación sostenida del principio activo así mismo, mediante la manipulación de diversos parámetros experimentales, se espera obtener un tamaño definido de NP con el fin de alcanzar y permanecer en el sitio de acción pudiendo ser una posible alternativa para el tratamiento de enfermedades orales, lográndose una mejor actividad contra microorganismos orales (De Jong WH y Borm O. 2008).

4. HIPÓTESIS

Las formulaciones de NP con los extractos incorporados de *Ocimum basilicum* (Albahaca) *Calendula officinalis* (Cálendula) así como los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* (Clavo) y *Thymus vulgaris* (Tomillo), actuarán como sistemas de liberación controlada del activo y mostrarán actividad antimicrobiana contra patógenos orales.

5. OBJETIVOS

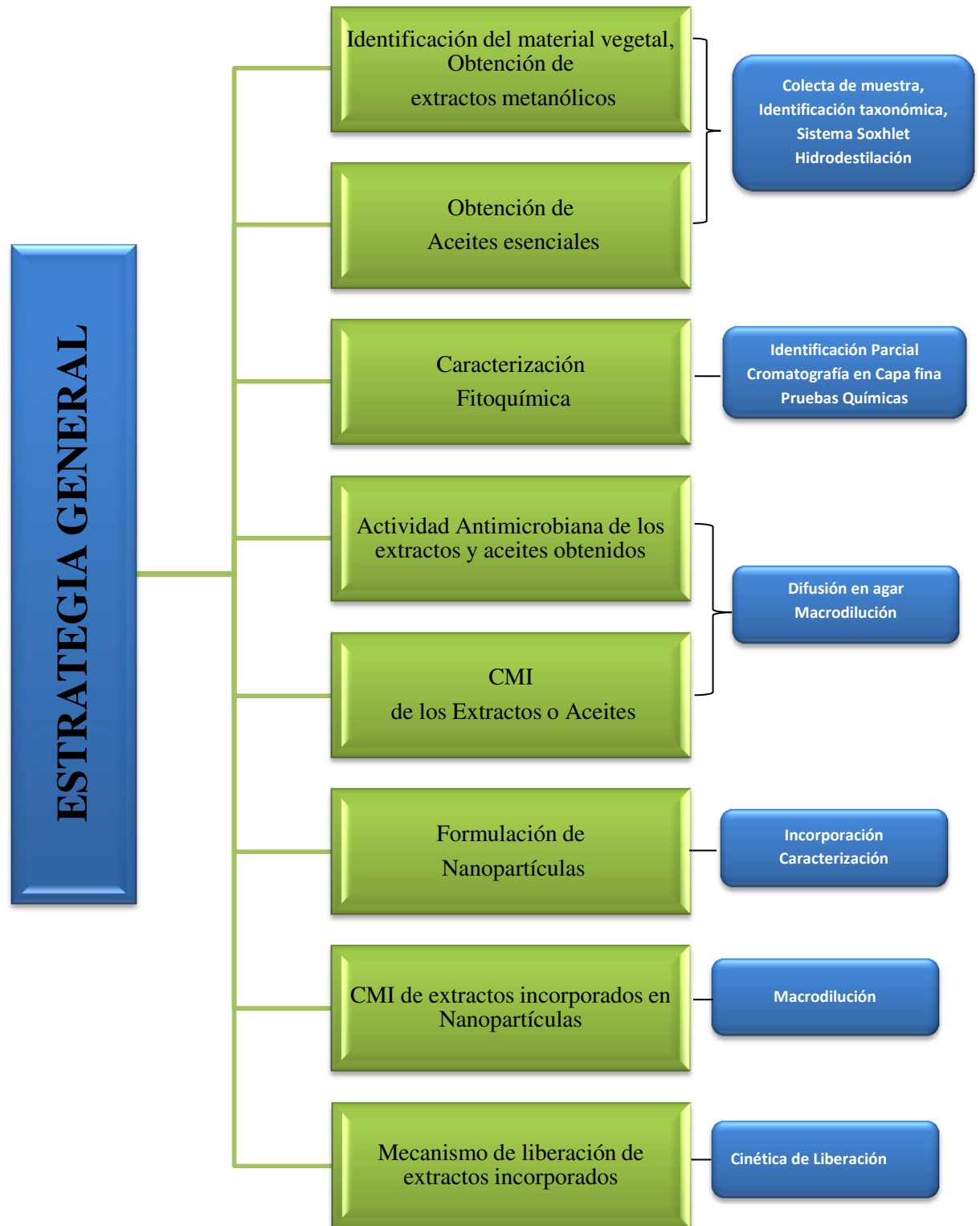
5.1 Objetivo general

Desarrollar formulaciones de nanopartículas poliméricas con extractos vegetales de *Ocimum basilicum* (Albahaca) *Calendula officinalis* (Cálendula) así como los aceites esenciales de *Syzigium aromaticum* (Clavo) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) encapsulados para su evaluación antimicrobiana *in vitro* contra microorganismos patógenos orales.

5.2 Objetivos específicos

- a) Obtener y caracterizar fitoquímicamente los extractos metanólicos de las plantas *Ocimum basilicum* (Albahaca) y *Calendula officinalis* (Caléndula) así como los aceites esenciales de *Syzigium aromaticum* (Clavo) y *Thymus vulgaris* (Tomillo).
- b) Determinar la concentración mínima inhibitoria *in vitro* de los extractos de *Ocimum basilicum* y *Calendula officinalis* así como de los aceites esenciales de *Syzigium aromaticum* y *Thymus vulgaris* contra los microorganismos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* y *Candida albicans* (ATCC).
- c) Estandarizar la técnica de nanoprecipitación para incorporar los extractos vegetales y aceites esenciales en nanopartículas poliméricas y caracterizar las partículas, en función de su tamaño, liberación *in vitro* y eficiencia de encapsulación del compuesto principal del aceite.
- d) Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos y aceites esenciales incorporados en nanopartículas poliméricas contra los microorganismos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* y *Candida albicans* (ATCC).

DIAGRAMA DE FLUJO



6. METODOLOGÍA

6.1. Obtención de extractos y aceites

6.1.1 Descripción e Identificación Taxonómica

Las muestras del material vegetal a evaluar se obtuvieron de lugares de venta en Monterrey N.L, México y posteriormente una muestra de cada producto fue empacada en un sobre y etiquetada. Se entregaron en el departamento de botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas para su identificación taxonómica para la entrega de voucher de identificación.

6.1.2 Obtención de los extractos

Las plantas *Ocimum basilicum* (Albahaca) y *Calendula officinales* (Cálendula) se pulverizaron empleándose un molino manual. De cada muestra se pesaron 250 g y por medio de la técnica soxhlet se realizó la obtención de los extractos, se empleó como solvente el metanol (CTR Scientific, México). Posteriormente, la muestra previamente secada y pulverizada fue colocada en el aparato de extracción con 600 mL de metanol. Cada mezcla se colocó en reflujo continuo durante 20 h. El extracto metanólico obtenido se llevó a sequedad a presión reducida utilizando un rotavapor (Rotavapor R-205 Büchi, Brinkman Instruments, inc., Wesbury, NY). Finalmente, los extractos se concentraron y se guardaron en frascos de vidrio protegidos de la luz y humedad para su posterior uso (Bates Schaefer 1977; Hostettmann y Terreaux, 2000).

6.1.3 Obtención de aceites esenciales

De las muestras de las plantas *Syzygium aromaticum* (Clavo) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) se obtuvieron los aceites esenciales. Colocándose una muestra de 250 g de botones florales secos pulverizados en un matraz de 1,000 mL con 500 mL de agua destilada y sometidos a hidrodestilación por 8 h. Finalmente, los aceites obtenidos fueron tratados con Na_2SO_4 anhidro, filtrados y colocados en tubos ámbar con tapa rosca y conservados a 4 °C (Günther E. 1948).

6.2. Caracterización Fitoquímica

Una vez obtenidos los extractos se procedió a su caracterización fitoquímica por dos métodos básicos, la cromatografía en capa delgada comparativa y los métodos químicos de identificación de grupos funcionales, se siguió el siguiente procedimiento: se prepararon diversos sistemas eluentes, benceno- acetona, cloroformo-metanol (a una proporción de 9:1 y 9:2), benceno- acetona- metanol (9: 2: 2), cloroformo- benceno- acetato de etilo- acetona (9: 9: 2: 2), cloroformo- acetato metanol (7: 5: 2). Con el fin de valorar la separación de las fracciones de los extractos y aceites en la cromatoplaça. El R_f se determinó midiendo la distancia del punto de aplicación de la muestra a la mitad de la mancha detectada y se dividió el valor obtenido sobre la distancia del punto de aplicación de la muestra a la distancia recorrida por el eluente (Huacuja ER 1995).

6.2.1. Cromatografía comparativa

Posteriormente, se desarrolló una cromatografía comparativa en capa fina para valorar la presencia de los principales compuestos reportados en los aceites esenciales, empleándose diversos estándares (eugenol, timol, borneol, pineno) en placas de sílica gel 10 x 2.5 cm. Se realizó la separación cromatográfica de los extractos sobre la placa empleando diversos eluentes. Después de eluída se dejó secar perfectamente, se localizaron las bandas deseadas por medio de luz ultravioleta y las placas se revelaron con cloruro de cobalto. Este mismo método fue empleado para las formulaciones obtenidas de NP con extracto encapsulado. (Bolliger, HR., *et al.*, 1965).

6.2.2. Métodos químicos para la identificación de grupos funcionales

Como un análisis químico preliminar para identificar la presencia de grupos funcionales de los compuestos involucrados con la actividad antimicrobiana se realizaron las siguientes pruebas sobre los extractos e identificar grupos químicos de acuerdo a lo señalado por Domínguez X. A., 1973.

▪ *Prueba de Liebermann Burchard:*

Para determinar la presencia de tripterpenos y compuestos esteroidales (esteroles y metilesteroles). Se disolvieron 1.5 mg de muestra en cloroformo y luego se añadieron dos gotas del reactivo, la prueba es positiva al observar cambios de coloración. El reactivo se preparó agregando una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1.0 mL de anhídrido acético y 1.0 mL de cloroformo.

▪ *Prueba de Salkowski:*

Para identificar esteroles y metilesteroles. En esta prueba a 2 mg de muestra se añadieron dos gotas de cloroformo y dos gotas de ácido sulfúrico, se desarrolló un color amarillo o rojo en caso de ser positiva su presencia.

▪ *Prueba de Shinoda:*

Se realizó para identificar la presencia de compuestos de tipo flavonoide (chalconas, flavononas, flavonoles, flavononoles, ó xantonomonas) a 1 mg de la muestra disuelta en etanol se le agregaron limaduras de magnesio y unas gotas de HCl por la paredes. Se consideró positiva con la aparición de color anaranjado, rojo, azul o violeta.

▪ *Prueba de Baljet:*

Para sesquiterpenlactonas, se utilizaron 2 soluciones que se mezclaron en volúmenes iguales previamente, la solución A, un gramo de ácido pícrico en 100 mL de etanol; la solución B, 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. El reactivo se preparó mezclando 5 mL de A, 4 mL de B y 100 mL de agua, la prueba fue positiva si se presenta una coloración anaranjado o roja oscura.

▪ *Prueba de Ácido sulfúrico:*

Para compuestos tipo flavonoide; se colocaron dos gotas de la muestra, dos gotas de ácido sulfúrico concentrado; se observa coloración amarilla para flavona y flavonoles, anaranjado o guinda para flavonas, rojo azulado para chalconas y quinonas con coloración rojo púrpura.

▪ *Prueba de Bromo en Tetracloruro de Carbono:*

Para insaturaciones; en 4 gotas de la muestra en un tubo de ensaye se le agregó 4 gotas en la solución de bromo al 2 % en tetracloruro de carbono; si la coloración de la solución desaparece en un principio se consideró positiva.

▪ *Prueba Permanganato de Potasio:*

Para insaturaciones; se disolvieron 2 gotas de la muestra en dos gotas de agua, acetona o metanol y se le agregaron dos gotas de la solución de permanganato de potasio al 2 % en agua; acetona metanol, se consideró la prueba positiva si se presentó un precipitado color marrón.

▪ *Prueba de Cloruro Férrico:*

Para oxhidrilos fenólicos, se disolvió una pequeña cantidad de la muestra en etanol y se le añadió dos gotas de la solución de cloruro férrico en agua al 2.5 %; la aparición de una coloración o precipitado rojo, azul, violeta o verde se consideró positiva.

▪ *Prueba de Molisch:*

Para carbohidratos; en un tubo de ensaye se agregaron 3 gotas de la muestra y 3 gotas del reactivo, disolviendo 1 g de alfa naftol en 100 mL de etanol al 95 %; y se agitó. Después se inclinó el tubo y se depositó 2 mL de ácido sulfúrico concentrado por la pared; la prueba se consideró positiva si se formó un anillo coloreado en la interfase.

▪ *Prueba del Hidróxido de sodio al 10 %:*

Para cumarinas; en dos gotas de la muestra se hicieron reaccionar con dos gotas de una solución acuosa o alcohólica dando un color amarillo o anaranjado que desaparece al agregar dos gotas de HCl.

▪ *Prueba de Wagner:*

Para efectuar la prueba se agregaron dos gotas del reactivo formado por 1.27 g de yodo resublimado y 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua y dos gotas del extracto; se consideró positiva la prueba si se observó un precipitado marrón.

▪ *Prueba de Dragendorff:*

Modificación de Munier y Machelobuf, para la determinación de alcaloides. Para ello se prepararon dos soluciones, la solución A con 0.85g de nitrato de bismuto, los cuales se mezclaron con 10 mL ácido acético glacial y 40 mL de agua y solución B con 8 g de yoduro de potasio disuelto en 20 mL de agua. A 2 mg de muestra se agregaron 4 gotas del reactivo; la prueba fue positiva si se presentaron coloraciones rojo o naranja.

6.3. Actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos naturales

Para los ensayos microbiológicos fueron activadas las cepas ATCC de los microorganismos a investigar, *Streptococcus mutans*, 700611, *Streptococcus gordonii* 10558 y *Candida albicans* 90029, proporcionados por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología UANL. La activación de las cepas se realizó en la campana de flujo laminar. Se inocularon los microorganismos en caldo tripticaseína de soya colocándolos en los tubos eppendorf sellados con papel parafilm, y fueron incubados a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 24 h. Posteriormente, una alícuota de 100 μL del crecimiento bacteriano se depositó en cajas de agar sangre de carnero y agar Saboraud, haciendo una siembra por extensión en placa. Finalmente, se incubaron a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24 h. El ajuste del inóculo se realizó mediante la toma de 3 a 5 colonias de cada una de las cepas a estudio (de similar morfología y purificadas a partir de los medios selectivos) en 5 mL de caldo Müller Hinton y Saboraud para obtener una suspensión equivalente al estándar de turbidez 0.5 McFarland.

Método de difusión en pozo. Brevemente, de una suspensión microbiana ajustada al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland, se tomaron 100 μL y se sembraron en placas de agar

Müller Hinton, en pozos de 6 mm de diámetro se inocularon 20 µL de extractos y aceites de clavo y tomillo empleándose como disolvente DMSO y como control a una solución de clorhexidina a 0.12 % p/v. Finalmente, las placas fueron incubadas a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24 horas y el diámetro de la zona de inhibición se midió en milímetros mediante un calibrador vernier. La prueba se realizó por triplicado y se repitió en tres ensayos independientes (Cantón R *et al.*, 2000).

6.3.1 Concentración mínima inhibitoria de extractos sin encapsular

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual es definida como la concentración más baja de activo que pueda inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas. Se evaluaron los extractos y aceites esenciales mediante el método de dilución en tubo, contra *S. mutans*, *S. gordonii* y *C. albicans*. Se emplearon tubos de 13 x 100 mm, se activaron y ajustaron las cepas a 0.5 de la escala de Mc Farland que corresponde a un crecimiento de 1.5×10^8 UFC/mL (Erna Cona T, 2002). Se empleó medio Muller Hinton y se inocularon con 100 µL de cada extracto y aceite solubilizados en DMSO a diferentes concentraciones (1000 a 31µg/mL), así como 100 µL de inóculo ajustado, para evaluar la actividad de los extractos, comparando con los controles clorhexidina al 0.12 % como control positivo, y negativo DMSO, valorándose por triplicado para cada muestra. Posteriormente, se incubaron a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ y se compararon con los controles de crecimiento y de esterilidad. Se dio lectura de manera cualitativa además de medir la turbidez por espectrofotometría visible a 540 nm a las 24 h. La CMI, se determinó cualitativamente y se corroboró con la menor absorbancia entre las concentraciones probadas, después de restar la turbidez de los controles de extractos y de su concentración a evaluar.

Finalmente, 100 µL de cada tubo fueron sembrados con el asa de driblasky con la técnica de plating y se incubaron a 37°C durante 24 h, realizando el conteo de las UFC para corroborar la actividad antimicrobiana mostrada por el método de dilución en tubo.

6.4. Preparación de nanopartículas poliméricas cargadas con extracto

En base a la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos y aceites sin encapsular, se realizó la selección del extracto más activos contra las cepas evaluadas, para dar continuidad a su encapsulación en nanopartículas poliméricas (NP) las cuales fueron preparadas mediante la técnica de nanoprecipitación propuesta por Fessi et al, (1989), (Figura. 3). Brevemente, 5 mg de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo), y diferente masa del polímero encapsulador Eudragit® E100 (copolímero aniónico a base de ácido metacrílico y acrilato de etilo) fueron disueltos en un solvente miscible en agua (5 mL de metanol); formando la fase orgánica. Posteriormente, la fase orgánica fue inyectada a velocidad constante a 15 mL de una fase acuosa, manteniendo en agitación continua y moderada. Finalmente, el solvente fue evaporado a presión reducida (Rotavapor Laborata 4003, Heidolph Instruments, Alemania) a fin de obtener una suspensión acuosa, de NP purificadas, las cuales se caracterizaron, en función de su tamaño, liberación *in vitro* y eficiencia de encapsulación del eugenol (componente principal del aceite).

Para conseguir la formulación deseada se realizó la evaluación del comportamiento de dos variables experimentales del proceso, la masa de polímero y relación de fases acuosa-orgánica y se determinó su efecto sobre el tamaño de las NP obtenidas, con la finalidad de estandarizar la técnica y obtener partículas con tamaños inferiores a 200 nm. Se preparó una fase orgánica con cantidades de polímero desde 40 a 200 mg solubilizados en metanol. La relación de fases acuosa-orgánica evaluadas fueron, 5:1, 3:1 y 2:1.

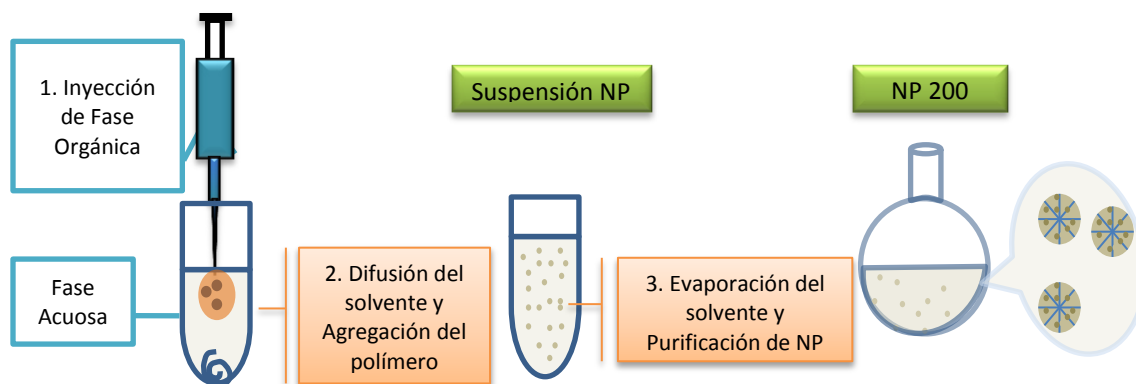


Figura. 3 Técnica de Nanoprecipitación para la encapsulación del aceite esencial de *Syzigium aromaticum* (clavo) en nanopartículas poliméricas.

6.4.1 Caracterización física de las nanopartículas

El tamaño de partícula se determinó por espectroscopía de correlación fotónica (Zetasizer Nano ZS90 Malvern Instruments Reino Unido), para lo cual una alícuota de la suspensión de NP purificadas se diluyó en agua bidestilada, cada medición se realizó por triplicado. Posteriormente mediante microscopia electrónica de barrido (LEO-435VP) se analizaron muestras de la formulación de nanopartículas con el aceite encapsulado para corroborar el tamaño de partícula y la morfología obtenida.

6.4.2 Porcentaje y eficiencia de encapsulación

La determinación del porcentaje y de la eficiencia de encapsulación del componente principal que se encuentra en el aceite encapsulado (eugenol), se realizó a partir de NP con el aceite de clavo incorporado; fueron centrifugadas a 25,000 rpm por 4 h a 5°C (Allegra 64 R Centrifuge, Beckman-Coulter, Brea, CA). Posteriormente, la pastilla de NP fue liofilizada a -48 °C/120 mbar por 16 h (Free Zone 2.5 L Freeze Dry System, Labconco Corp., Kansas City, MO) y una cantidad conocida de pastilla se disolvió en metanol y fue analizada por cromatografía de gases-masas (GC-MS) como se describe en el siguiente apartado. El porcentaje y eficiencia de encapsulación, se calcularon considerando las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Encapsulación} = \frac{\text{eugenol encapsulado (g)}}{\text{NP cargadas con eugenol (g)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\% \text{ Eficiencia de Encapsulación} = \frac{\text{eugenol encapsulado (g)}}{\text{eugenol en la fase orgánica (g)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

6.5. Caracterización del extracto incorporado en NP por cromatografía gases masas

Las formulaciones de NP con el aceite de clavo se analizaron para establecer la cantidad de componentes presentes en la muestra e identificar la presencia del componente principal incorporado en NP.

La cuantificación e identificación se realizó mediante la comparación del tiempo de retención así como el porcentaje de concordancia entre las muestras y el estándar por cromatografía de gases masas. Las muestras analizadas fueron el aceite esencial de clavo obtenido y la formulación de NP cargadas con el aceite, empleando un cromatógrafo de gases 6890N con inyector split/splitless y detector selectivo de masas 5973 (Agilent Technologies, Alemania) con fuente de ionización de impacto electrónico y analizador cuadrupolar. La separación se realizó con una columna HP 5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Agilent Technologies, Alemania). El gas acarreador fue helio con un flujo de 1.0 mL min⁻¹. El programa de temperatura del horno consistió en una etapa inicial a 80 °C por 1 min, subiendo 10 °C min⁻¹ hasta 200 °C manteniendo 3 min a esta temperatura, finalmente se incrementó a una velocidad de 15 °C min⁻¹ hasta llegar a 320 °C y se mantuvo por 8 min. La temperatura del inyector fue de 270 °C y la de la línea de transferencia de 250 °C. La adquisición de los datos se realizó en modo de barrido completo en un rango de 30-550 m/z. La identificación de los compuestos se realizó con la base de datos de la librería Wiley 7 n.l.

6.6. Liberación *in vitro* del eugenol encapsulado en las nanopartículas

Se prepararon sistemas con buffer a pH 5, se adicionaron alícuotas de la formulación con el encapsulado a cada uno de los sistemas en diferentes tiempos (0 – 24 h) y en agitación lenta, se tomaron muestras de cada uno de los sistemas realizándose la extracción con cloroformo del aceite, para cuantificar por GC-MS al componente principal liberado. Los resultados obtenidos fueron ajustados a modelos matemáticos (Tabla 1), los cuales permitieron establecer la cinética y mecanismo de liberación del eugenol a partir de las NP como un proceso dependiente del tiempo (Siepmann J & Siepmann F. 2008, Aragón, J. *et al.*, 2011).

Tabla 1. Ecuaciones matemáticas para los modelos utilizados para describir la liberación del eugenol a partir de las NP

Model	Ecuación
Cinética de orden cero	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = K \times t$
Cinética de primer orden	$\log C = \log C_0 - Kt^{1/2}$
Higuchi	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = K \times t^{1/2}$
Korsmeyer-Peppas	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = \log K \times t^n$

Dónde: Mt/M_{∞} es la fracción de soluto que se ha liberado a un tiempo t y K es la constante de velocidad de liberación; n es el exponente que indica el mecanismo de liberación del activo.

6.7. Actividad antimicrobiana de NP cargadas con aceite de clavo

Las formulaciones de NP purificadas con aceite de clavo encapsulado fueron centrifugados durante 3 h a 25,000 rpm. La pastilla de NP se resuspendió a un volumen de 2 mL con agua bidestilada a una concentración de aceite de 800 µg/mL y se esterilizaron mediante filtración con tubos millipore esteriflip EXPRESS PLUS Membrane (0.22 µm) de 50 mL. Posteriormente, se determinó la actividad antimicrobiana de las NP con relación al tiempo de liberación, mediante la técnica de macrodilución en tubo, sobre *S. mutans* a las 24, 48 y 72 horas de liberación del aceite encapsulado en las NP, realizando lo siguiente: se tomaron alícuotas de la suspensión de NP esterilizadas y se incubaron en tubos de ensayo con 3 mL de medio Müller Hinton a diferentes concentraciones finales de aceite (75, 150, 300 y 600 µg/mL). Cabe mencionar que *S. mutans* se inoculó a las 0, 24 y 48 horas de liberación para completarse los tiempos de exposición mencionados en un principio. Además, se evaluaron paralelamente los controles de NP sin aceite y clorhexidina sin encapsular al 0.12 % p/v.

7. RESULTADOS

7.1. Identificación del material vegetal, Obtención de Extractos

El material vegetal de *Ocimum basilicum* (Albahaca) *Calendula officinales* (Cálendula), *Syzigium aromaticum* (Clavo) y *Thymus vulgaris* (Tomillo), fue identificado con un número de voucher 025573, 025574, 025575, 025576, respectivamente para cada muestra analizada.

7.1.2. La Clasificación taxonómica de *Ocimum basilicum* (Albahaca).

En la figura 4 se observa la parte aérea de la planta utilizada en esta investigación. Y según literatura la taxonomía de *Ocimum basilicum* es la siguiente:

Reino	Plantae
Subreino	Angiosperma
División	Magnoliophytina
Clase	Dicotyledonea
Subclase	Lamiidae
Familia	Lamiaceae
Tribu	Asteraceae
Género	<i>Ocimum</i>
Especie	<i>basilicum</i>



Figura. 4 Parte aérea de *Ocimum basilicum* (Albahaca).

7.1.3. Clasificación y descripción botánica de *Calendula officinalis* (Cálendula)

En la Figura 5 se observa la muestra de flor utilizada en este estudio. Según Muley BP (2009), la clasificación taxonómica de *Calendula officinalis* es la siguiente:

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asterideae
Familia	Asterales
Tribu	Asteraceae
Género	<i>Calendulae</i>
Especie	<i>Officinalis</i>



Figura 5. Flor de *Calendula officinalis* (Cálendula).

7.1.4. Clasificación y descripción botánica de *Syzygium aromaticum* (Clavo)

La figura 6 muestra los capullos de la planta utilizada en la presente tesis. Según Wren, (1994), la Clasificación taxonómica de *Syzygium aromaticum* (Clavo) es la siguiente:

Reino	Plantae
Subreino	Vegetal
División	Myrtineae
Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotyledoneae
Familia	Myrtaceae
Tribu	Myrtiflorae
Género	<i>Syzygium</i>
Especie	<i>aromaticum</i>



Figura 6. Capullos de *Syzygium aromaticum* (Clavo).

7.1.5. Clasificación y descripción botánica de *Thymus vulgaris* (tomillo)

Finalmente, la figura 7 muestra la parte aérea utilizada del tomillo. Según Fan, W. (2008) su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino	Plantae
Subreino	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Thymus</i>
Especie	<i>vulgaris</i>



Figura 7. Parte aérea de *Thymus vulgaris* (Tomillo).

7.1.6. Rendimiento de Extracción

Posteriormente, se determinó el rendimiento de los extractos metanólicos de *Ocimum basilicum* (Albahaca), *Calendula officinalis* (Cálendula) mediante Soxhlet, y se obtuvo una eficiencia de 12.40% y 29.45%. Para el caso de los aceites esenciales obtenidos mediante hidrodestilación a partir de *Syzygium aromaticum* (Clavo) y *Thymus vulgaris* (Tomillo), el rendimiento fue de 2.20 % y 0.29 % respectivamente (Tabla 2).

7.2. Caracterización fitoquímica

En la identificación parcial de grupos funcionales (Tabla 2), mediante las pruebas coloridas, los extractos respondieron de manera positiva para esteroides, terpenos, flavonoides y para grupos oxhidrúlos fenólicos. Por otro lado los aceites esenciales fueron positivos para terpenos y oxhidrúlos fenólicos

Tabla 2. Rendimientos y caracterización fitoquímica de extractos metanólicos y aceites esenciales obtenidos			
<i>Especie</i>	<i>Parte de planta</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>Identificación parcial de compuestos***</i>
<i>Ocimum basilicum</i> (Albahaca) *	Aérea	12.40	Terpenos Esteroles
<i>Calendula officinalis</i> (Caléndula)*	Flor	29.45	Flavonoides Oxhidrilos fenólicos
<i>Syzigium aromaticum</i> (Clavo)**	Frutos	2.20	Terpenos
<i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo)**	Aérea	0.29	Oxhidrilos fenólicos

Extracción por soxhlet (*); extracción por hidrodestilación (**); pruebas colorimétricas (***).

7.3. Cromatografía en capa delgada (CCD)

Para la separación cromatográfica de *Ocimum basilicum* (Albahaca) empleándose como fase móvil benceno:acetona 9:1 y para *Calendula officinalis* (Cálendula) se identificaron 3 fracciones visualizadas al revelado con CoCl_2 . En relación a los aceites esenciales para *Syzigium aromaticum* (Clavo) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) empleando la fase hexano/acetona 9:1 se identificaron para el primero dos fracciones y para el segundo cuatro visualizadas al revelado con CoCl_2 para ambos. En la tabla 3 se presentan los diferentes R_f evaluados para las diferentes fracciones encontradas en cada uno de los extractos y aceites.

Tabla 3. Fracciones identificadas en cada extracto y aceites			
Planta	Sistema eluyente (9:1)	Rf	Revelado CoCl ₂
Albahaca	3 *	0.4, 0.5, 0.6	--
Caléndula	3 *	0.15, 0.4, 0.65	--
Clavo ⁺	2 **	0.2 y 0.75	✓
Tomillo ⁺	4 **	0.50, 0.67, 0.78, 0.84	✓

Benceno/Acetona (*), hexano/acetona (**); aceites esenciales (+).

Respecto a la cromatografía comparativa realizada para los aceites esenciales obtenidos se identificó analogía entre la primera fracción y el estándar de eugenol, con un Rf de 0.75. Se puede presumir la presencia del eugenol en el aceite de clavo obtenido (Figura. 8 A, B). Por otro lado, para el aceite de tomillo existió concordancia entre los valores de Rf de 3 fracciones correspondiendo a eugenol, timol y borneol con Rf de 0.9, 1.2, 1.5 respectivamente visualizadas al revelado U.V y con CoCl₂ para ambos (Figura. 8 C, D).

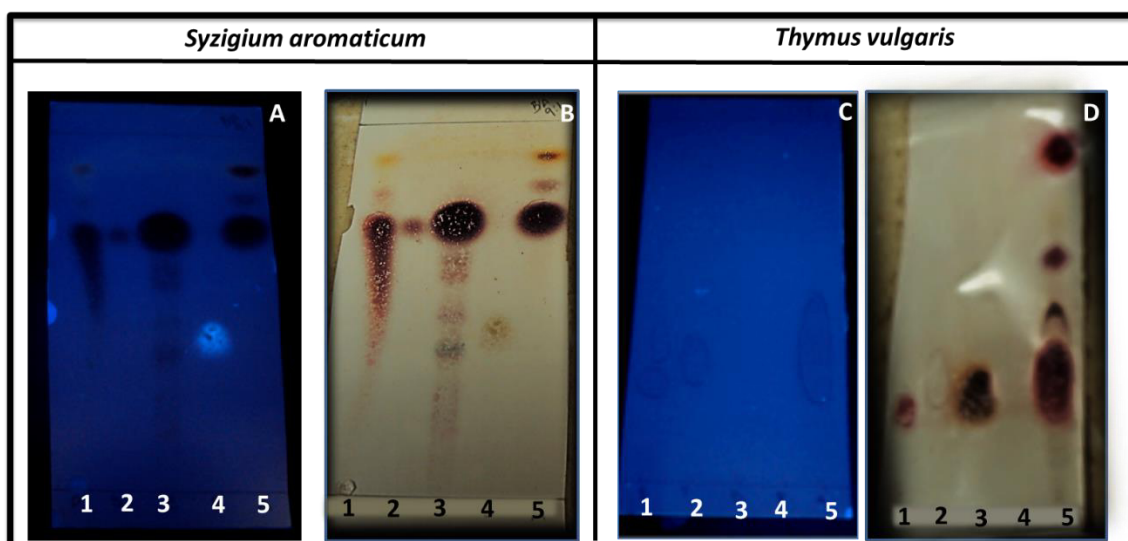


Figura 8. Cromatografía comparativa del aceite de esencial sin encapsular de *Syzigium aromaticum* (A5, B5) y *Thymus vulgaris* (C5,D5); de las NP con aceite de *S. aromaticum* encapsulado (A1 y B1) y de su sobrenadante (A2 y B2) y de los estándares eugenol (A3, B3, y C1, D1) , timol (C2 y D2), borneol (A4, B4 y C3, D3), pineno (C4 y D4); revelados con UV (A, C) y cloruro de cobalto (B, D).

7.4. Actividad Antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales obtenidos sin encapsular

En el ensayo preliminar antimicrobiano de los extractos y aceites obtenidos en el presente trabajo mediante el método de difusión en agar, se determinó que el aceite de clavo fue el más activo contra los microorganismos a estudio ya que se observó actividad inhibitoria en la mayoría de las concentraciones evaluadas.

En lo que respecta a la determinación de la CMI, se identificó actividad antimicrobiana para los extractos y aceites a la concentración de 1000 µg/mL después de 24 h de incubación, mostrando el mayor efecto inhibitorio contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus gordonii*, con un halo de inhibición promedio de 17 mm, seguida por la de 500 y 250 µg/ml con un diámetro de 16, 14 y 13 mm respectivamente. Para *Candida albicans*, las concentraciones de 1000 y 500 µg/mL fueron activas, con un diámetro promedio de 8.2 y 6.5 mm respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>S. aromaticum</i> sin encapsular contra <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus gordonii</i> , y <i>Candida albicans</i> ATCC, a las 24 h de exposición.								
Microorganismos	PROMEDIO INHIBICIÓN (mm)							
	DMSO	Clorhex. 0.12 %	Aceite de <i>S. aromaticum</i> (µg/mL)					
			1000	500	250	125	62	31
<i>S. mutans</i>	0	19.00 ± 0.5	17.50 ± 0.4	16.93±0.2	13.33±0.29	10±0.87	0	0
<i>S. gordonii</i>	0	18.00±	17.00±0.07	14.06±0.93	13.11±0.29	9.33±0.29	0	0
<i>Candida albicans</i>	0	12.05±0.50	8.00±0.50	6.50±0.50	0	0	0	0

Clorhex: Clorhexidina 0.12 % (n=3).

Por otro lado, mediante la técnica de macrodilución se determinó cualitativamente la actividad inhibitoria de los extractos y los aceites esenciales coincidiendo con la actividad antimicrobiana identificada contra los tres microorganismos. Así mismo, los aceites fueron activos a las cuatro primeras concentraciones evaluadas.

Se determinó como CMI para los extractos evaluados contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus gordonii* la concentración de 250 µg/mL, para los aceites probados fue de 125 µg/mL, estos últimos contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus gordonii* mostraron un comportamiento bactericida al verificarse en el sembrado en agar a la mayor concentración únicamente; siendo el aceite de *S. aromaticum* con la mejor acción bactericida. Finalmente, la CMI identificada contra *Candida albicans*, correspondió para los extractos, la concentración de 1000 µg/mL y para los aceites fue la de 500 µg/mL (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria de extractos y aceites esenciales sin encapsular contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Candida albicans* ATCC.

Planta Microorganismo	<i>Ocimum basilicum</i> (Albahaca)									<i>Caléndula officinales</i> (Cálendula)									<i>Syzygium aromaticum</i> (Clavo)									<i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>S. mutans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-		
<i>S. gordonii</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-		
<i>C. albicans</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-		

Concentraciones: 1 (1000), 2 (500), 3 (250), 4 (125), 5 (62), 6 (31), 7 (15) µg/mL, 8 (DMSO), 9 clorhexidina 0.12% p/v.

Crecimiento +

Sin crecimiento -

7.5. Incorporación del aceite de *Syzygium aromaticum* en nanopartículas y su caracterización física

Se seleccionó el aceite de clavo para su incorporación en las formulaciones de NP, debido a que mostró la mayor actividad antimicrobiana en comparación del resto de los extractos analizados en esta investigación.

Inicialmente, se determinó el efecto de diferentes variables de la técnica de nanoprecipitación sobre el tamaño de partícula e índice de polidispersidad. Se observó que la concentración del polímero tuvo un comportamiento directamente proporcional con respecto al tamaño de partícula, obteniéndose NP con tamaños promedios de 65 a 280 nm (Figura. 9A).

Por otro lado, se encontró que el tamaño de las NP sostienen un comportamiento inversamente proporcional con respecto a la relación de fases, obteniéndose tamaños

desde 70 a 180 nm (Figura. 9B). Mostrando ambas variables influencia de forma directa sobre el tamaño de las partículas.

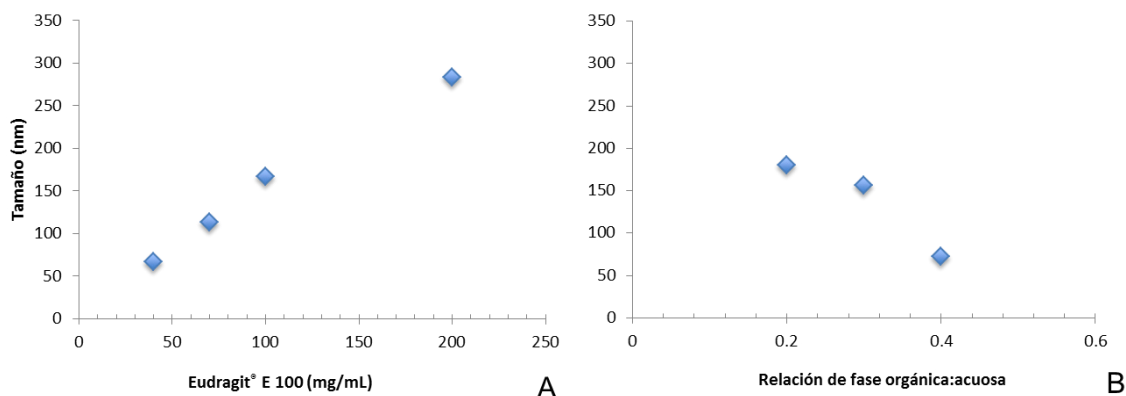


Figura 9. Efecto de la concentración de polímero (A), Relación de fase acuosa/orgánica (B) sobre el tamaño de NP (n=3).

Específicamente, las formulaciones con 100 mg de polímero y con una relación de fases acuosa-orgánica de 3:1 mostraron tamaños homogéneos de partícula menores a 200 nm características deseadas para los estudios microbiológicos; siendo éstas las condiciones de las variables utilizadas para el desarrollo de la formulación de NP con los extractos encapsulados.

La caracterización de NP sustentó que las formulaciones fueron homogéneas en tamaño, con un índice de polidispersidad de 0.082 nm y con un tamaño de partícula ≈ 157 nm por medio del análisis por espectroscopia de correlación fotónica (Figura 10 A). Mediante el análisis por microscopia electrónica de barrido se corroboró que las formulaciones de NP tuvieron tamaño y distribución homogénea con morfología esférica (Figura. 10 B).

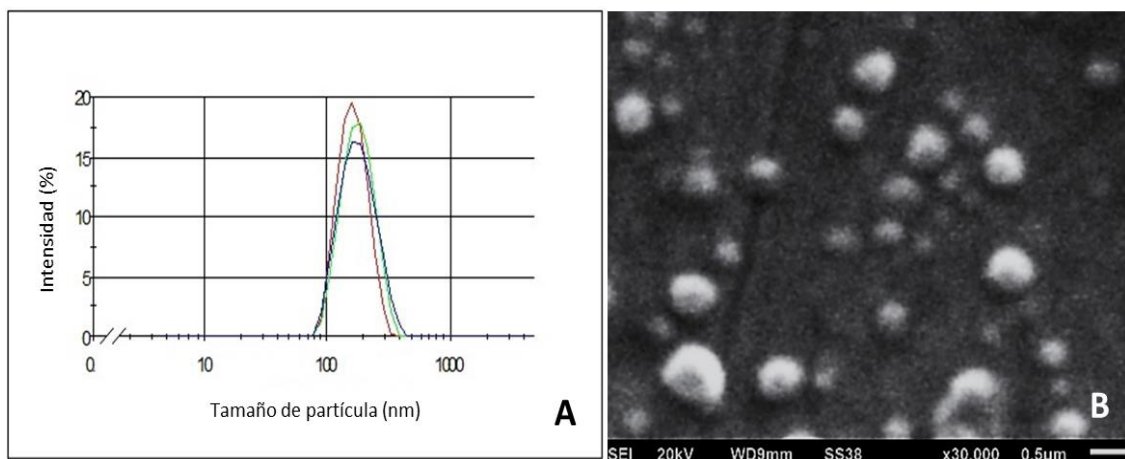


Figura 10. Tamaño, distribución y morfología de nanopartículas, por espectroscopía de correlación fotónica (A) y por microscopía electrónica de barrido (B).

7.5. Análisis de contenido de las nanopartículas poliméricas

Inicialmente, en lo que respecta a la presencia y los porcentajes de encapsulación del componente principal (eugenol) del aceite incorporado en NP, fueron observados por medio de cromatografía comparativa empleándose como controles estándares de los principales compuestos contenidos en el aceite de clavo que se han reportado en literatura, tales como borneol y eugenol (Figura. 8A, B). Así mismo se verificó y comparó su presencia y contenido con el estándar de eugenol por medio del análisis de cromatografía de gases masas lo que permitió además corroborar y cuantificar los porcentajes de encapsulación del eugenol.

En la Tabla 6 se presentan los compuestos mayoritarios presentes en el aceite de *Syzygium aromaticum* sin encapsular, con su correspondiente tiempo de retención y porcentaje de área, la cual es mayor para el eugenol que es justamente el componente principal del aceite de clavo con un porcentaje igual al 67.5 % calculado mediante los perfiles cromatográficos del estándar de eugenol libre (Figura 12). Así mismo en el reporte del aceite encapsulado en las NP (Figura 13), se aprecia claramente la presencia del compuesto que produce el pico de mayor abundancia en el aceite, correspondiendo a un tiempo de retención de 12.50 minutos tanto para el aceite sin encapsular como para el encapsulado.

Componentes mayoritarios del aceite de <i>Syzygium aromaticum</i>. Tiempo de retención para cada compuesto identificado (tr) y el % de Área (abundancia).		
Compuestos Encontrados	Tr (min)	% Área
Alfa-Terpinoleno	4.89	0.43
p-Alinalisol (Estragol)	6.25	0.58
p-Alilfenol	6.91	0.19
Timol	7.45	1.41
Eugenol	8.50	67.5
Alfa-Copaeno	8.73	0.28
Vanilina	8.95	1.15
Trans-Cariofileno	9.33	16.26
Alfa-Humeleno	9.75	3.14
Germacreno- d	9.99	0.14
Acetato de eugenol	10.52	4.16
B Cariofileno	11.36	2.05
Cinamaldehido	12.96	0.52

Tabla 6. Identificación de componentes mayoritarios del aceite de *Syzygium aromaticum*, con el tiempo de retención para cada compuesto identificado (tr) y el % de Área (abundancia).

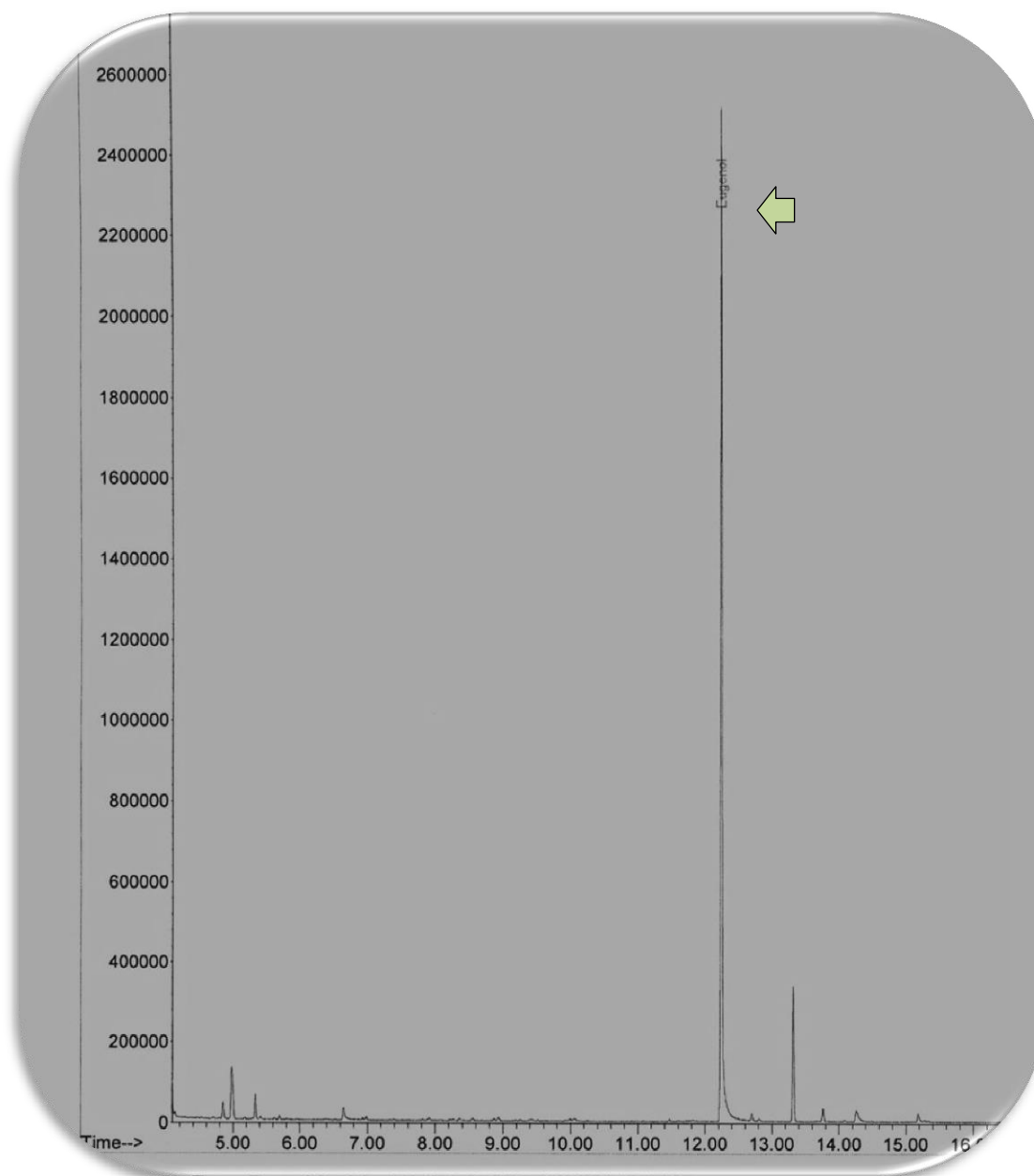


Figura 12. Cromatograma del estándar eugenol obtenido por cromatografía de gases masas. Condiciones de análisis: Temperatura Inicial: 250°; Tiempo de análisis 21 min, Columna HP 5-MS, 0.25 mm 0.25 μ m; Velocidad de flujo: 1mL/min Helio

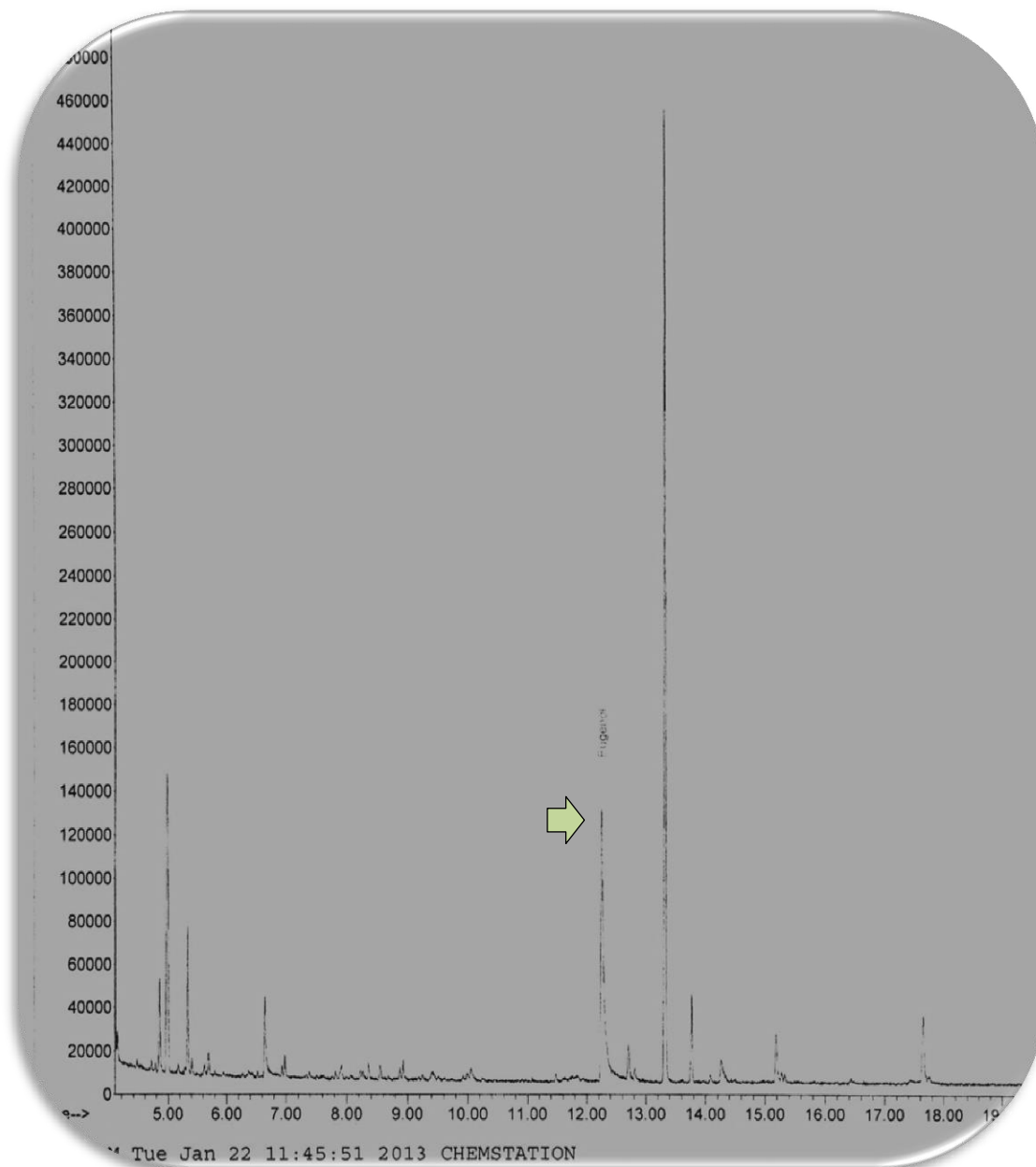


Figura 13. Cromatograma del aceite extraído de las NP. Condiciones de análisis: Temperatura Inicial: 250°, Tiempo de análisis: 21', columna HP 5-MS, 0.25 mm 0.25 μ m. Velocidad de flujo: 1mL/min Helio; 1.791.5mG de aceite *S. aromaticum*.

Finalmente, mediante el análisis cromatográfico instrumental y con apoyo de las ecuaciones 1 y 2, de la sección 6.7.2. fue posible determinar que existe un 47 % de eficiencia de encapsulación del eugenol y un porcentaje de encapsulación del 73.16 %.

7.6. Cinética de liberación *in vitro* del aceite de clavo a partir de las nanopartículas poliméricas

Se evaluó el perfil de liberación *in vitro* de la formulación para determinar el efecto del pH sobre la liberación del aceite encapsulado. La Figura 14 muestra que la formulación liberó alrededor del 10 % de eugenol incorporado a partir de la primer hora de exposición al medio, mostrando una liberación gradual hasta las 24 h, tiempo en el que se observa una liberación del eugenol cercana al 48 %; por lo que podría mencionarse que se tiene un sistema de liberación gradual del eugenol con respecto al tiempo y dependiente del pH.

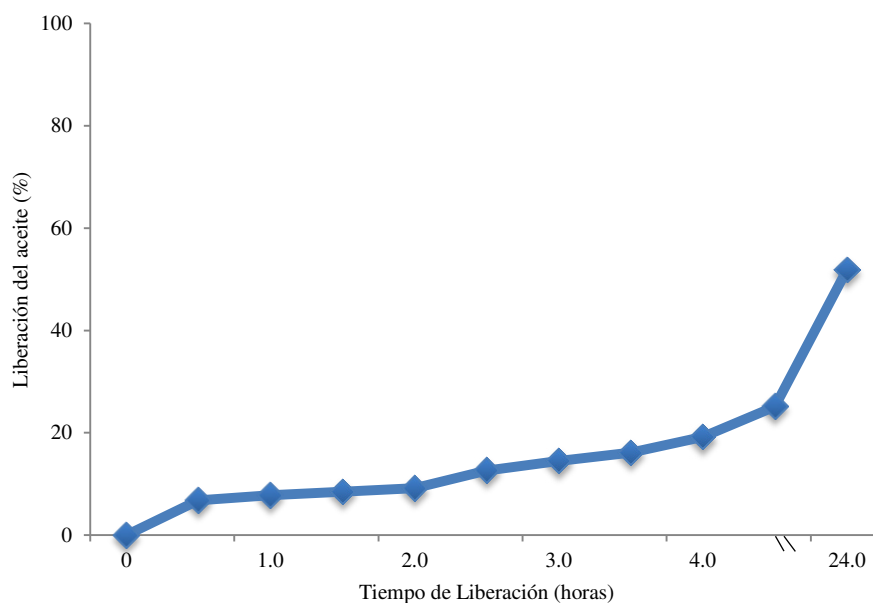


Figura 14. Cinética de liberación a pH 5, del eugenol presente en el aceite *S.aromaticum* encapsulado en NP (n=3)

En relación a la caracterización de la liberación del aceite de clavo encapsulado en las NP, los resultados obtenidos de la cinética de liberación fueron considerados para describir el mecanismo mediante el cual se da dicha liberación, para ello, se evaluó el ajuste de los resultados a modelos matemáticos que describen diferentes mecanismos de liberación. Se obtuvieron los valores de los coeficientes de correlación (r^2) y se encontró

que el mecanismo de liberación propuesto por Higuchi (Tabla 7), mostró el mejor ajuste, el cual, describe un mecanismo de liberación del aceite desde una matriz insoluble, como un proceso dependiente del tiempo basado en un proceso de difusión de tipo Fickiano.

Tabla 7. Modelos matemáticos utilizados para describir la liberación del eugenol	
Modelo	r²
Higuchi	0.984
Orden cero	0.629
Primer orden	0.886
Kornsmeyer-Peppas	0.712

7.7. Actividad antimicrobiana con respecto al tiempo de liberación del aceite a partir de las nanopartículas

En relación a la actividad antimicrobiana presentada durante la liberación del aceite encapsulado, se pudo observar que éste mostró actividad antimicrobiana a las dos mayores concentraciones probadas de 300 y 600 µg/mL a 24h. Respecto a las 48 h de liberación se determinó que las concentraciones mantuvieron su actividad antimicrobiana, además se pudo observar que la concentración de 150 µg/mL presentó inhibición del crecimiento bacteriano. Finalmente para el ensayo de 72h de liberación, se observó que las cuatro concentraciones seleccionadas para esta prueba, es decir, 75, 150, 300 y 600 µg/mL mostraron inhibición de crecimiento sobre el microorganismo a estudio (Tabla 8).

Tabla 8. Actividad antimicrobiana con respecto al tiempo de liberación del aceite de <i>S. aromaticum</i> incorporado en NP contra <i>S. mutans</i> (n=3).			
Concentración (µg/mL)	Tiempo (h)		
	24	48	72
Clorhexidina 0.12% p/v	+	+	+
NP blanco	-	-	-
75	-	+	+
150	-	+	+
300	+	+	+
600	+	+	+

Crecimiento (-), Inhibición (+)

Finalmente, las NP en este estudio mostraron una liberación *in vitro* del eugenol encapsulado, y por lo tanto una actividad antimicrobiana a partir de las 24 h, manteniéndose dicha actividad a las 72 horas. Lo que nos permite sugerir que el aceite se libera a partir de las nanopartículas poliméricas conforme al tiempo (Figura 15).

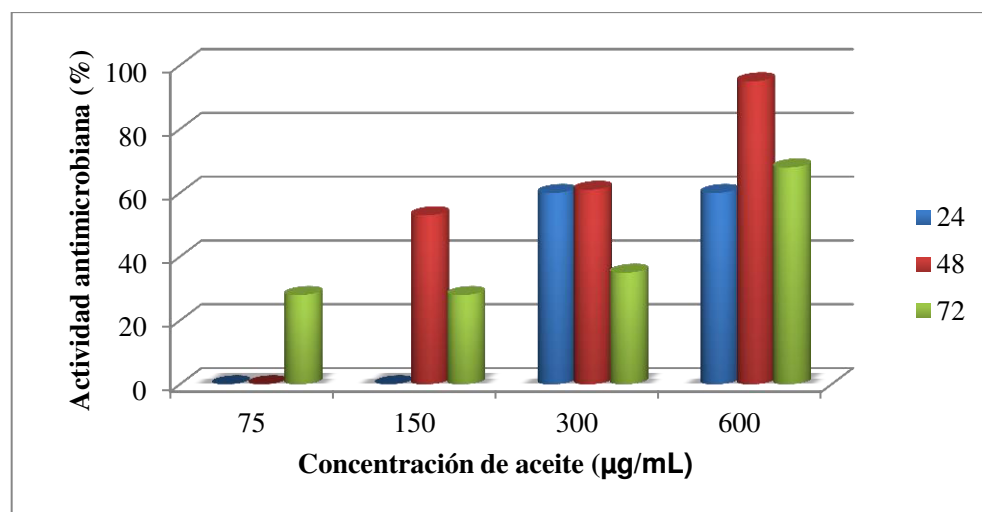


Figura 15. Actividad antimicrobiana con respecto a la liberación del aceite de *S. aromaticum* incorporado en NP de Eudragit E100 sobre *S. mutans* (n=3).

8. DISCUSIÓN

Diversos autores han reportado la extracción con soxhlet como un método que brinda una alta eficiencia de extracción, concordando con los resultados obtenidos en esta investigación para las especies de plantas estudiadas (Tabla 2).

Por otro lado, el método de hidrodestilación es el mayormente utilizado para aislar aceites esenciales. En el presente trabajo se encontró un porcentaje de recobro del 2.20 % para el aceite de clavo y para el aceite de tomillo del 0.29 % siendo esto un típico resultado según muestra la literatura (Mohammad Amzad et al., 2014). El porcentaje de recobro y la composición química de aceites volátiles son influenciados por la composición genética de la planta, las condiciones ambientales entre otros factores (Byramoglu et al 2008, Luchesi et al 2006, Ferhat et al 2005 y Kosar *et al.*, 2005).

El objetivo de esta tesis ha sido la extracción del material vegetal y el análisis cromatográfico por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) del aceite esencial obtenido con mayor actividad biológica a partir de las muestras presentes en el mercado en Monterrey, México previamente a su incorporación en nanopartículas. Los diferentes materiales vegetales analizados en el presente estudio fueron extraídos y posteriormente caracterizados mediante pruebas fitoquímicas básicas por reacciones coloridas y por cromatografías comparativas, encontrándose la presencia de grupos funcionales o estructuras químicas esperadas, ya que estas han sido reportadas por otros autores, sin embargo; el objetivo de dichos análisis en este estudio se centró en tomar los resultados como medida de control para verificar la calidad del material, es decir, verificar que los componentes potencialmente bioactivos previamente reportados se encontraban presentes. Como se mencionó previamente, los resultados concuerdan con lo reportado y mostraron que los vegetales disponibles en el comercio en la ciudad de Monterrey cuentan con características potencialmente aceptables para su empleo en ensayos biológicos.

De acuerdo a las pruebas coloridas, la caracterización fitoquímica preliminar resultó positiva para terpenos, esteroides, flavonoides y oxidrilos fenólicos. Tomando en cuenta que se analizaron extractos de naturaleza poco polar (principalmente aceites esenciales de clavo y tomillo), los grupos de mayor presencia fueron los que poseían baja polaridad, entre los cuales se encontraron terpenos y oxidrilos fenólicos (Tabla 2).

La siguiente etapa, posterior al análisis fitoquímico básico consistió en realizar ensayos de actividad antimicrobiana de los diferentes extractos obtenidos. Se pudo observar que los extractos evaluados presentaron actividad antimicrobiana contra los microorganismos evaluados en la presente investigación resaltando su interés en la salud oral. Dicha actividad era esperada puesto que otros investigadores han probado extractos de estos vegetales como antimicrobianos aunque no se han encontrado reportes de la inhibición de estos patógenos orales por extractos de albahaca o caléndula. Sin embargo, para los fines que persigue el presente trabajo el aceite esencial de clavo fue el único material considerado para continuar los objetivos de desarrollar una formulación de NP incorporando el producto natural y la posterior evaluación de su desempeño contra los patógenos ensayados, esta decisión fue tomada debido a que el aceite de clavo presentó una destacada actividad antimicrobiana.

La composición de diversos ingredientes bioactivos del aceite esencial de clavo depende de la distribución geográfica, así como las condiciones ambientales, tales como temperatura, precipitación, altitud, horas de sol, etc. Los diferentes ingredientes bioactivos pueden afectar las actividades biológicas y químicas. En el presente estudio, se identificaron pocos compuestos en los aceites esenciales ya que la mayoría de los componentes químicos son volátiles y se evaporaron durante el tiempo de procesamiento de las muestras o debido a la extracción a temperaturas elevadas. El eugenol, el Transy beta cariofileno, el humuleno y el acetil eugenol son ingredientes bioactivos predominantes en los aceites esenciales, utilizados principalmente en el área de perfumería, como aromatizantes y en el área de medicina como antiséptico y anestésico local siendo el eugenol, un compuesto químico principal en el aceite de clavo y considerado como la principal molécula responsable de la gran variedad de sus

actividades estudiadas, (Alma et al, 2007; Kamel *et al.*, 2007). Resultados que concuerdan con lo encontrado en este estudio.

A sí mismo, se han reportado diversos estudios donde explican la presencia de timol y carvacrol en el aceite de tomillo, siendo los principales compuestos responsables de la actividad antimicrobiana (OMS 2009).

Inicialmente, se realizó la optimización del método de nanoprecipitación para obtener NP con tamaños homogéneos cercanos a 200 nm. Se determinó que al modificar variables, como la concentración de polímero utilizando un volumen constante de la relación de fase orgánica-fase acuosa; o bien utilizando una masa de polímero constante variando la relación de fases orgánica-acuosa mostraron influencia sobre el tamaño de partícula. En el presente trabajo, se observó que al aumentar la cantidad de polímero en la fase orgánica, el tamaño de partícula también aumenta debido a que hay más cadenas poliméricas disponibles para la agregación del polímero formando las NP. Por otro lado, el incremento en el volumen de la fase orgánica, se obtuvieron partículas de menor tamaño; permitiendo tener una formulación con condiciones óptimas para obtener NP de una morfología esférica con tamaños cercanos a 200 nm con el aceite de clavo encapsulado; y para ello se utilizó 100 mg de polímero y una relación de fases orgánica-acuosa de 3:1; obteniendo NP con características físicas adecuadas para realizar estudios biológicos (Neil Desai, 2012).

En este estudio, se estableció que la liberación del eugenol presente en el aceite de clavo incorporado en NP tuvo un mecanismo de liberación tipo Fickiano, siendo este un fenómeno de difusión que permite la relajación de las cadenas del polímero en las NP una vez que entran en contacto con el buffer ácido, permitiendo la liberación gradual de la sustancia incorporada con respecto al tiempo (Nokhodchi *et al.*, 2002; Sáez et al., 2003; Serrano & Cornejo, 2011). Existen diversos estudios donde se establece que la liberación de activos se realiza de manera lenta, coincidiendo con lo obtenido en esta investigación (Lollo, 2012). En las primeras horas del estudio no se observó actividad del aceite incorporado en la formulación de NP; sin embargo, a medida que se analizó la actividad antimicrobiana del aceite conforme al tiempo, se pudo observar actividad de

las formulaciones de NP, las cuales mostraron el mismo comportamiento a lo propuesto en estos estudios de liberación prolongada, ya que al completar las 24 h de exposición, se liberó solamente el 50 % del aceite encapsulado. Por lo que se puede proponer que en formulaciones de aceite sin encapsular, la actividad del aceite sobre el microorganismo a estudio sería inmediata y que sí a estas formulaciones se añade el aceite en NP poliméricas se contaría con un efecto inmediato y sostenido.

Posteriormente, se evaluó la actividad antimicrobiana y se determinó la CMI del aceite de clavo. Se observó que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* obtenido en este estudio por hidrodestilación presentó actividad antimicrobiana importante con CMI y CMB para *Streptococcus mutans*, correspondiendo a 390 y 780 µg/mL respectivamente, equiparable a las concentraciones reportadas por otros autores (Khan *et al.*, 2009). Existen estudios que reportan para este mismo microorganismo y para *Streptococcus sanguis* una CMI a 310 µg/mL, así como para otros microorganismos orales los cuales también han sido sensibles al aceite de clavo donde ha mostrado ser activo a las concentraciones de 512, 310 y 160 µg/mL contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Actinomyces viscosus* respectivamente. Por otro lado, se ha reportado que la CMI del aceite esencial de clavo de la India sobre cepas de *Candida albicans* varía desde 1,000 hasta 2,500 µg/mL, reportado por Nzeako and Lawati (2008). En base a lo descrito, y de acuerdo con los criterios establecidos por Sartoratto et al (2004), donde se establece que los aceites esenciales con CMI entre 50 y 500 µg/mL son considerados de fuerte actividad antimicrobiana, aquellos con una CMI entre 600 y 1500 µg/mL son considerados de actividad moderada y cuando los aceites presenten una CMI mayor de 1500 µg/mL han de considerarse como actividad baja, es posible considerar para este estudio y bajo las condiciones experimentales analizadas, que el aceite esencial de *S.aromaticum* tiene fuerte actividad antimicrobiana ya que la CMI fue de 250 µg/mL. Concordando con estudios realizados por otros autores (Rhayour, 2003; Ayoola *et al.*, 2008).

Por otro lado, una vez evaluada la actividad antimicrobiana del aceite obtenido, incorporado en las formulaciones de NP, se pudo comprobar que está actividad se

mantiene incluso posterior a los procesos de obtención y caracterización de las NP. Cabe destacar que para las formulaciones de NP la CMI fue inferior a la del aceite sin encapsular, siendo de 75 µg/mL, este comportamiento de partículas poliméricas con antibiótico incorporado ha sido estudiado por otros autores donde se ha reportado que las concentraciones activas disminuyen cuando el activo se encuentra encapsulado en comparación con su desempeño cuando se ensaya de forma libre. Una de las explicaciones que se han estudiado es la capacidad que presentan las partículas de adsorberse a los patógenos debido que el material polimérico que las constituye presenta interacciones con los constituyentes presentes en la superficie de los microorganismos, específicamente se han mencionado copolímeros de ácido metacrílico, es decir, el mismo material utilizado en el presente estudio (Langer y Peppas, 1981; Langer *et al.*, 1990).

Respecto a las posibles ventajas que tendría la utilización de los sistemas nanoparticulados obtenidos en esta investigación, tales como mejorar el efecto terapéutico por prolongar la actividad biológica mediante el control de la velocidad de liberación de fármacos con lo que además se disminuye la frecuencia de administración, durante las últimas dos décadas, se han realizado innumerables trabajos para desarrollar nanomedicinas más eficaces a partir de polímeros biocompatibles y biodegradables. Las aplicaciones de estos polímeros como materiales de entrega de activos ha sido revisado exhaustivamente por Kumari *et al.*, (2010).

Dillen *et al.*, (2006) prepararon nanopartículas poliméricas a partir de Eudragit® RS100 y RL100/PLGA para incorporar ciprofloxacina por la técnica de doble emulsión agua en aceite agua (W/O/W) evaporación de disolvente, posteriormente realizaron un análisis de liberación del activo y determinaron la actividad antimicrobiana de las formulaciones contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Sus resultados mostraron liberación prolongada del activo a partir de las NP para todas las formulaciones probadas.

Gupta *et al.*, (2010) desarrollaron nanopartículas por la técnica de nanoprecipitation para la encapsulación de esparfloxacina para aplicación oftálmica, con la finalidad de mejorar el tiempo de residencia precorneal y penetración ocular; caracterizando la formulación

de NP por diversas propiedades como el tamaño de partícula, potencial zeta, liberación del fármaco *in vitro*, y estabilidad. Además se evaluaron las propiedades antimicrobianas que fueron probadas contra *Pseudomonas aeruginosa* por la técnica de extensión en placa. Los resultados de este estudio indicaron que nanopartículas de EGLP con esparfloxacina incorporada, produce una entrega oftálmica del activo que mejora el tiempo de residencia precorneal y la penetración ocular.

Cheow *et al.*, (2010) examinaron las características físicas de formulaciones de NP de EGLP y PCL preparadas por el método de emulsificación - evaporación del solvente, en las cuales se evaluaba la incorporación de antibióticos derivados de fluoroquinolonas, específicamente ciprofloxacina y levofloxacina. Además se evaluó la capacidad antimicrobiana de estas formulaciones contra biofilm de *E.coli*. Los resultados mostraron que debido a su alta eficiencia de encapsulación y a su alta eficacia antibacteriana en dosis bajas las formulaciones de NP con ciprofloxacina encapsulada representan una buena alternativa contra dichos biofilms.

Finalmente, en el presente estudio se ha demostrado también que los valores de CMI y CMB de un extracto vegetal con actividad antimicrobiana disminuyeron significativamente cuando el material vegetal fue incorporado en NP, en comparación con los valores obtenidos el compuesto sin encapsular 75 y 250 µg/mL, respectivamente, además, la actividad antimicrobiana se mantiene considerablemente durante un tiempo prolongado al liberarse de manera gradual a un pH ácido (Langer y Peppas, 1981; Langer *et al.*, 1990).

9. CONCLUSIONES

En este estudio fue posible elaborar una formulación reproducible para la encapsulación de aceites esenciales en NP que incorporan extracto vegetal con tamaños aceptables para su evaluación biológica. Bajo las condiciones experimentales analizadas, las formulaciones de NP poliméricas cargadas con el aceite de clavo mostraron que el aceite no se libera de manera inmediata, por lo que dichas partículas funcionan además de vehículo como un sistema reservorio de principios activos de origen vegetal, para brindar un efecto antimicrobiano potencializado de liberación sostenida. Este tipo de formulaciones pasan a convertirse en una promesa para la investigación de principios activos de origen natural incorporados en NP y permitir el fortalecimiento en la terapia Odontológica.

10. PERSPECTIVAS

Estudios recientes han demostrado una gran variedad de agentes antimicrobianos empleados hoy en día, lo que ha favorecido la aparición de cepas resistentes a la terapéutica empleada debido al uso indiscriminado de los mismos.

Una estrategia innovadora involucra el uso potencial de las nanopartículas poliméricas como acarreadoras de fármacos, donde la incorporación de principios activos entre ellos los extractos obtenidos de plantas, representa una herramienta útil para dar continuidad en la investigación ya que brindan ventajas como un tratamiento antimicrobiano con gran potencial para el control de infecciones y contaminación bacteriana con aplicación odontológica.

Se requieren, por ejemplo, datos confiables sobre la estabilidad de las formulaciones de NP bajo diferentes condiciones, específicamente, la liberación de activo en la suspensión, la estabilidad en su morfología conforme al tiempo. Así como estudios de liofilización y re suspensión que permitan aumentar la estabilidad de las formulaciones. Por otro lado, es conveniente contar con ensayos “*in vivo*” que permitan determinar la penetrabilidad de las NP en zonas de importancia oral como el surco gingival, así mismo, evaluar la presencia del activo con respecto al tiempo, esto con la finalidad de establecer el posible aumento de residencia del agente responsable de la actividad biológica en el sitio de interés.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abarca, S., y Francisco, L. (2014). Fotosíntesis, crecimiento y aceites esenciales en morfotipos florales de caléndula (*Calendula officinalis* L.).

Alma HM, Ertas M, Nitz S y Kollmannsberger H. (2007). Research on essential oil content and chemical composition of Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). *BioResources*; 2: 265-269.

Ara Roldán Alfredo. (2004). 100 Plantas Medicinales Escogidas“, 4a Ed. 2004. Ed. EDAF, S.A.

Argueta V.A, Cano Asseleih LM, Rodarte ML. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional.

Ayoola GA, Lawore FM, Adelowotan T, Aibinu IE, Adenipekun E, Coker HAB, Odugbemi TO. (2008). Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove). *Afr J Microbiol Res*; 2:162-166.

Badria F.A., Zidan O.A. (2004), Natural products for dental caries prevention. *J.Med food*;7: 381-4.

Bates RB, Schaefer JP. (1977). Técnicas de investigación en química orgánica. Editorial Prentice/may Internacional: Madrid España, pp. 45-49, 83-89, 95-97.

Bidault P., Chandad F., Grenier D. (2007). Risk of bacterial resistance associated whit systemic antibiotic therapy in periodontology. *J Can Dent Assoc*, 73: (8): 721-5.

Borchers AT, Keen CL, Stern JS, Gershwin ME. (2000). Inflammation and native American medicine: the role of botanicals. *The American journal of clinical nutrition* 72:339-47.

Boutekedjiret, C.; Bentahar, F.; Belabbes, R.; and Bessiere, J. M. (2003). Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*; 18, pp. 481–484.

Cantón R, García JE, Gómez L, Martínez L, Rodríguez C, Vila, J, García J.A, (2000) Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos. Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos, en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editor Picazo JJ. <http://www.seimc.org>.

Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. (2007) The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytother Res*; 21:501-506.

Chan Y, Lai CH, Yang HW, Lin WY, Chan C CH. (2003). The Evaluation of Chinese Herbal Medicine Effectiveness on Periodontal Pathogens. *The American Journal of Chinese Medicine*. 31: 751–761.

Cheow WS, Chang MW, and Hadinoto K. (2010). Levofloxacin-Loaded Polymeric Nanoparticles Against *E. coli* Biofilm Cells: The Effect of Antibiotic Release Profile. *Pharm Res*; 27:1597–1609

Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J. P., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., & Rodríguez-Landa, J. F. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Rev Biomed*, 14.

Cowan MM. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12(4):564-582.

Cuevas-Sánchez, J. A. (2004). Ponencia impartida durante el Encuentro de Canasta de Semillas, 19 y 20 de noviembre 2004, Universidad Autónoma de Chapingo.

Damgé C., Maincent P., Ubrich N. (2007), Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats, *J. Control. Release.* 117. 163-170.

De Campos A., Sánchez A., Alonso M. (2010), Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A, *Int J. Pharm.* 224: 159.

De Jong W. H. and Borm O.J. (2008), Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards, *Inter. J. Nanomed;* 3(2):133-149.

Dillen K, Vandervoort J, Mooter GV, Ludwig A. (2006) Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. *Int J Pharm;* 314: 72-82.

FAN, W., y otros. (2008), The use of tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp during storage in ice. *Food chemistry*., Vol. 6., Pp 108, 148- 153

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. (1989) Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm;* 55: R1-R4.

Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, Efferth T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother Res;* 21:989-994

Galindo-Rodríguez S.A., Allemann E., Fessi H., Doelker E. (2005) Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst;*22(5):419-642.

García-Alvarado JS, Verde-Star MJ, Heredia NL. (2001). Traditional Uses and scientific knowledge of medicinal plants from Mexico and Central America. A review. *J. Herbs Spi. Med Plants* 8(2/3):37-89.

Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. (2010) Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*; 6, 324-333.

Hakki M. A., Murat Ertas, Siegfried Nitz and Hubert Kollmannsberger. (2007). Chemical composition and content of essential oil from the bud cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.), Review ncsu.edu/ Bio resources; 2(2), 265-269.

Hossain MA, Harbi SRA, Weli AM, Al-Riyami Q, Al-Sabahi JN. (2014) Comparison of chemical constituents and antimicrobial activities of three essential oils from three different brands' clove samples collected from Gulf region *Asian Pac J Trop Dis*; 4(4): 262-268.

Hostettmann K, Terreaux C. (2000). Search for new Lead Compounds from higher Plants. *Chimia*. 54:652-657.

Huacuja L, Puebla AM, Carranco A, Miranda ML, Merchant H, Reyes A, Guzmán A. (1997). Contraceptive effect on male rats after oral administration crude extract. *Adv Contraceptive Delivery Syst*; 13:13-21.

Inder SR, Aarti SR, Ram CR. (2011). Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. *Braz J Microbiol*; 42: 1269-1277.

Iñigo, L. U. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del sistema sanitario de Navarra* Vol. 28, Nº 2, 153-298.

- Islam Bhuiyan MN. (2012). Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzigium caryophyllatum* (L.) Alston); *AJPP* 6(16): 1260-1263.
- Jones, C. G. (1997). Chlorhexidine: is it still the gold standard?. *Periodontology* 2000, 15, 55.
- Kamel C, Hafedh H, Tarek Z, Amel BKN, Mahmoud R, Kacem M, Amina B. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. *Phytother Res*; 21: 501-506.
- Keene JL, Noakes DLG, Moccia RD, Soto CG. (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult Res*; 29:89-101.
- Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75: 1–18.
- Langer R, Cima LG, Tamada JA, Wintermantel E. (1990). Future directions in biomaterials. *Biomaterials*; 11: 738-745.
- Langer RS, Peppas NA. (1981). Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials*; 2: 201-214.
- Leroux J. C., Alleman E; Doelker E; and Gurny R. (1995). New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification - diffusion method. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 41: 14-18.
- Loesche WJ. (1986) Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*; 50:353-380.

Lollo G. (2012). *Nanocápsulas de poliaminoácidos para la liberación selectiva de fármacos antitumorales*. Doctoral thesis. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 334 pp. Availableat: http://dspace.usc.es/bitstream/10347/6082/1/rep_223.pdf.

Maita V. L.; Maita C. L. (2004); Tratamiento periodontal no quirúrgico, Enfoque Biológico.; Odontol. Sanmarquina, 8 (1): 51- 56.

Marsh, P. D., Martin, M. V., Lewis, M. A., & Williams, D. (2009). *Oral microbiology*. Elsevier Health Sciences.

Mendoza Muñoz, Piñón Segundo, Ganem Quintanar, (2007). Preparación y evaluación in vitro de Nanopartículas poliméricas biodegradables como agente de contraste para ultrasonido. Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, Vol. 10, Núm. 1, junio., pp. 14-20.

Mohanraj V. J., Chen Y. (2006), Nanoparticles -A review, trop. J. Pharm. Res. 5(1), 561-573.

Mombelli A, Samaranayake L.P. (2004). Tropical and systemic antibiotics in the management of periodontal diseases. Int Dent J. 54: (1): 3-14.

Moshfeghi A. A. and Peyman A.G. (2005), Micro- and nanoparticles. Adv. Drug Deliv. Syst., 57, 2047.

Muley BP, Khadabadi SS y Banarase NB. (2009). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Astraceae): A review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 8 (5): 455-465.

Muñoz F. (1996), Plantas medicinales y aromaticas., Madrid, España, Ed. Mundi Prensa., pp.15-20.

Muruganadan S, Srinivasan K, Chandra S, Tandan SK, Lal J and Raviprakash V. (2001). Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. *Fitoterapia*; 72:369-375.

Neil Desai. Challenges in Development of Nanoparticle-Based Therapeutics. (2012); *The AAPS Journal*; 14 (2): 282-295.

Nimesh S., Manchanda R., Kumar R., Saxena A., (2006), Preparation characterization and in vitro drug release studies of novel polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 323, 146- 152.

Nokhodchi A, Zakeri-Milani P, Valizadeh H, Hassan-Zadeh D. (2002). Evaluación de microcápsulas de ácido acetilsalicílico preparadas con etilato de acetilcelulosa, etilcelulosa o sus mezclas, mediante una técnica de adición de emulsión no disolvente. *Arspharmaceutica*; 43: 135-147.

Noriega P, Dacarro C. (2008), Aceite foliar de *Ocoteaquixos* (Lam.) Kosterm: actividad antimicrobiana y antifúngica. *La Granja*; 7:3-8.

OMS. Informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales. (Ginebra 2004).

Padrón Márquez, Oranday Cárdenas, Rivas Morales. (2003), Identificación de compuestos de *Melia Azedrach*, *Syzygium aromaticum cinnamomum zeylanicum* con efecto inhibitorio, *CIENCIA UANL*, p.p. 333-338.

Pandey R., Ahmad Z., Sharma S., Khukker G. (2006), Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery, *Int J. Pharm.* 323, 146-152.

Picasso González KC. (2006). Localización de compuestos con efecto antimicrobiano de *Fluorencia cernua*, *Larrea tridentata* y *Caléndula officinalis*, sobre *Prevotella*

intermedia, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* y *Streptococcus intermedius*. Tesis para obtención de grado de licenciatura de Cirujano Dentista. Facultad de Odontología, UANL.

Pinto RC, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. (2006) Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*; 2: 8-21.

R. J. Gibbons and J. V. Houte, (1975). "Bacterial adherence in oral microbial ecology," Annual Review of Microbiology, vol. 29, pp. 19–44.

S. National Committee for Clinical Laboratory, "Methodology for the serum bactericidal test. Approved Guideline. Document M21-A, in press." National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. [Proyecto Paycit 2011-2012 clave CS 1078-11

Sáez V, Hernández E, López L. (2003). Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas. *Rev iberoampolim*;4:111-122.

Sánchez Govín E, Ida María Leal López, Leticia Fuentes Hernández y Carlos A. (2000) Estudio farmacognóstico de *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca), *Rev Cubana Farm*;34 (3):187-95.

Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol*; 35:275–280.

Schultes, R.E. (1978). The kingdom of plants. En: Thomson, W.A.E.(Ed.). Medicines from the Earth. Mc. Graw- Hill Book Co., New York, 208.

Serrano-Medina A, Cornejo-Bravo JM. (2011). Buffer effects on drug release kinetics from acidic hydrophobic gel discs. *J MexChemSoc*;55:02-06.

Sessou P, Farougou S, Sohounhloué D. (2012). Major component and potential applications of plant essentials oils as natural food preservatives: a short review research results. *International Journal of Biosciences*; 2, 8: 45-57.

Shafi PM, Rosamma MK; Jamil K, Reddy PS. (2002). Antibacterial activity of *S. cumini* and *S. travancoricum* leaf essential oils. *Fitoterapia*; 73:414-416.

Siepmann J, Siepmann F.(2008) Mathematical modeling of drug delivery. *Int J Pharm*; 364: 328-343.

Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*;70: 1-20.

Thien Fah, y Toole O'. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents., *TRENDS in Microbiology*, Vol.9 No.1, 34-39.

Tichy J, Novak J. (1998). Extraction, assay, and analysis of antimicrobials from plants with activity against dental pathogens (*Streptococcus* sp.). *J Altern Complement Med*;4:39-45.

Torrado-Truiti MC, Sarragiotto MH, Abreu Filho BA, Vataru-Nakamura C, Dias Filho BP. (2003). *In Vitro* antibacterial activity of a 7-O- β -D-glucopyranosyl-nutanocoumarin from *Chaptalia nutans* (Asteraceae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 98(2):283-286.

Vázquez-Nava, F., Vázquez-Rodríguez, E. M., Saldívar-González, A. H., Lin-Ochoa, D., Martínez-Perales, G. M., & Joffre-Velázquez, V. M. (2010). Association between obesity and dental caries in a group of preschool children in Mexico. *Journal of public health dentistry*, 70(2), 124-130.

Wren R. C. (1994). Enciclopedia de medicina Herbolaria preparados Botánicos. Tomo 1. Editorial Grijalvo.

Zheng GQ, Kenney PM, Lam LKT (1992). Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*). *J Nat Prod*; 55:999-1003.